

**Biomimetisches Modell eines Photosystems aus dem
pflanzlichen Photosyntheseapparat:**

**Energietransfermessungen und
Einzelmolekülspektroskopie an Fluoreszenzfarbstoff-
markiertem rekombinantem Lichtsammlerkomplex**

Dissertation
zur Erlangung des Grades

Doktor
der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Henriette Wolf-Klein
geb. in Mainz

Mainz, 2001

Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Struktur des LHCII	2
1.1.1	Kristallographisch aufgelöste LHCII-Struktur	2
1.1.2	<i>in vitro</i> -Rekonstitution	4
1.1.3	Struktur und Funktion des N-terminus	5
1.2	Energietransferprozesse	8
1.2.1	Resonanz-Energietransfer nach Förster	8
1.2.2	Energietransfer nach dem Dextermechanismus	8
1.2.3	Energietransferwege im LHCII	9
1.3	LHCII-Farbstoff-Konstrukte	13
1.3.1	Charakteristika der eingesetzten Farbstoffe	13
1.3.2	Farbstoffbindung an das Lhcb-1	16
1.4	Verwendung der LHCII-Farbstoff-Konstrukte	18
1.4.1	Einzelmolekülspektroskopie zur Charakterisierung des LHCII-internen Energietransfers	18
1.4.2	Technische Nutzbarkeit des Lichtsammelprinzips von LHCII	22
1.5	Ziele dieser Arbeit	28
2.	<u>Verwendete Geräte, Chemikalien und Organismen</u>	29
2.1	Geräte	29
2.2	Chemikalien	30
2.3	verwendete Lhcb-1-Mutanten	31
3.	<u>Methoden</u>	33
3.1	Markierung des Lhcb-1 mit Fluoreszenzfarbstoffen sowie Aufreinigung der Lhcb-1-Farbstoff-Konstrukte	33
3.1.1	Aliquotierung der Farbstoffe	33
3.1.2	Farbstoffmarkierung des Lhcb-1	33
3.1.2.1	Cy5.5-Markierungsansatz	33
3.1.2.2	NIR-Cy-Markierungsansatz	34
3.1.2.3	IRD38-Markierungsansatz	35
3.1.2.4	Maleimido-BTI-Markierungsansatz	36
3.1.3	Aufreinigung des farbstoffmarkierten Lhcb-1	36
3.1.3.1	Fällung	36
3.1.3.2	Präparative Gelelektrophorese	37
3.1.4	Detektion des farbstoffmarkierten Lhcb-1	39
3.1.4.1	Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
3.1.4.2	Absorptionsmessung mit dem Mikrotiterplatten-	41

Absorptionsmeßgerät	
3.2 Herstellung von aufgereinigten farbstoffmarkierten LHCII-Komplexen	42
3.2.1 Aufkonzentration der Lhcb-1-Proben mittels Ultrafiltration	42
3.2.2 Rekonstitution	42
3.2.3 Dichtegradientenzentrifugation	43
3.2.4 Photometrische Bestimmung des LHCII	44
3.2.5 Fluoreszenzmessungen	44
3.2.6 Trypsinverdau	45
3.3 Bestimmung des Energietransfers von Chla auf einen Farbstoff in LHCII-Farbstoff-Komplexen	46
3.3.1 Bestimmung des Donorquenchings	46
3.3.2 Bestimmung der sensibilisierten Akzeptorfluoreszenz	48
3.3.3 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten der Verwendeten Fluorophore	49
3.3.4 Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute der Verwendeten Fluorophore	49
3.4 Immobilisation von LHCII-His6 an Ni-NTA-HRP	50
3.4.1 Immobilisation von LHCII-His6 zur Charakterisierung im Fluoromax-2	50
3.4.2 Immobilisation von LHCII-His6 zur Charakterisierung mittels Einzelmolekülspektroskopie	51
3.5 Einzelmolekulare Fluoreszenzspektroskopie von LHCII-Monomeren und -Trimeren	52
3.5.1 Monomentaufnahme der LHCII-Fluoreszenz	53
3.5.2 Fluoreszenzveränderungen über die Zeit (Zeitspuren einzelner LHCII-Emissionen)	53
3.6 Herstellung der zwei neuen Proteinmutanten Glu6 und Lys6	54
3.6.1 Restriktion	54
3.6.2 Agarose-Gelelektrophorese	55
3.6.3 Gelelution und Quantifizierung	56
3.6.4 Ligation	56
3.6.5 Transformation	56
3.6.6 Midi-prep	57
3.6.7 Überprüfung des korrekten Oligonucleotideinbaus	57
3.6.8 Sequenzierung	57
3.7 Herstellung und Quantifizierung von Inclusion bodies	58
3.7.1 Inclusion body-Präparation	58
3.7.2 A280-Messung	58
3.8 Entfernen von SDS aus rekonstituiertem LHCII	59
3.9 Dünnschichtchromatographie zum SDS-Nachweis in LHCII-haltigen Proben	61

3.10	Herstellung von TiO₂-beschichteten Glasplatten	61
3.11	Immobilisation von LHCII auf TiO₂-beschichteten Oberflächen	62
4. - 6. <u>Ergebnisse</u>		
4.	<u>Die Erstellung eine biomimetischen Modells aus LHCII und angekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff</u>	64
4.1	Charakteristika der verwendeten Farbstoffe	64
4.1.1	Spektroskopische Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe	64
4.1.2	Spektroskopische Besonderheiten der verwendeten Farbstoffe	69
4.1.3	Försterkritischer Abstand R ₀	71
4.1.4	Redoxverhalten von Maleimido-BTI und Cy5.5	72
4.2	Energietransfer von LHCII auf verschiedene Energieakzeptoren	75
4.2.1	LHCII-Cy5.5	75
4.2.1.1	Energietransferbestimmung im LHCII-Cy5.5 mittels Donorquenching	76
4.2.1.2	Energietransferbestimmung im LHCII-Cy5.5 über die stimulierte Akzeptorfluoreszenz	77
4.2.1.3	Energietransfer von Chlb auf Cy5.5	81
4.2.2	LHCII-NIR-Cy	82
4.2.2.1	Optimierung der NIR-Cy-Markierung von Lhcb-1	82
4.2.2.2	Energietransfer von Chla auf NIR-Cy in LHCII-Komplexen	84
4.2.3	LHCII-IRD38	87
4.2.4	LHCII-BTI	90
4.2.4.1	Kopplung einer SH-reaktiven Gruppe an BTI	90
4.2.4.2	Erstellung eines biomimetischen Modells aus LHCII und Maleimido-BTI	91
4.2.4.3	Energietransfer von Chla auf Maleimido-BTI in LHCII-Komplexen	95
4.2.5	Stabilität der LHCII-Farbstoff-Konstrukte	98
5.	<u>Einzelmolekülspektroskopie an orientiert immobilisiertem LHCII</u>	99
5.1	Selektive Immobilisation von LHCII-His6 an HRP	99
5.1.1	Populationsmessungen am Fluoromax-2	99
5.1.2	Einzelmolekülspektroskopie zur Bestimmung der Bindungsselektivität von LHCII-His6	101
5.2	Einzelmolekülspektroskopische Versuche zum komplexinternen Energietransfer	103
5.2.1	Fluoreszenzpolarisationsmessungen am Monomer und Trimer	103
5.2.2	Bleichverhalten der Chlorophylle im Monomer und Trimer	106
6.	<u>Technische Nutzbarkeit der Lichtsammeleffizienz von LHCII</u>	108
6.1	Charakteristika der neuen Klone Lys6 und Glu6	108

6.2	SDS-Abreicherung über eine HAP-Säule	109
6.2.1	DC	110
6.2.2	Schwach denaturierendes Gel nach Sukenik <i>et al.</i> (1992)	110
6.3	LHCII-Immobilisation auf TiO₂	111
6.3.1	Bindung von LHCII-Cy5.5 an TiO ₂	111
6.3.2	Bindung von LHCII an TiO ₂ abhängig von der SDS-Konzentration im Medium	113
6.3.3	Erste Quantifizierung einer Komplexbindung	114
6.3.4	Spezifität der Proteinbindung	115
6.3.5	Versuche zur Immobilisierung von LHCII an TiO ₂ -beschichtetes ITO-Glas	116
7.	<u>Diskussion</u>	117
7.1	Biomimetisches Modell aus LHCII und angekoppeltem Energieakzeptor	117
7.1.1	Malemido-BTI erfüllt alle chemischen und spektroskopischen Eigenschaften eines Energieakzeptors für ein Biomimetisches Modell	117
7.1.2	Biomimetisches Modell aus LHCII und einem Energieakzeptor durch LHCII-BTI-Konstrukt realisiert	119
7.1.3	Der LHCII-N-terminus ragt nicht vollständig ausgestreckt weg vom Protein	124
7.1.4	Der Energietransfer im biomimetischen Modell ist ein Resonanztransfer	127
7.1.5	Der Resonanzenergietransfer wird am besten über das Donorquenching quantifiziert	128
7.2	Untersuchungen zum komplexinternen Energietransfer mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie	131
7.2.1	LHCII kann mit Hilfe der HRP an Glasoberflächen immobilisiert werden	131
7.2.1.1	LHCII-His6 immobilisiert selektiv über den „His6-tag“	131
7.2.1.2	LHCII-Trimere werden über HRP in einer Vorzugsrichtung immobilisiert	132
7.2.2	Der Energietransferweg im LHCII-Monomer ist nicht fest determiniert	134
7.2.3	Im LHCII kommt es zur Fluoreszenzlöschung durch die Bildung eines „trap state“	135
7.2.4	Zukünftige einzelmolekulare Fragestellungen am LHCII	137
7.3	Studien zur technischen Nutzbarkeit der Lichtsammeleffizienz von LHCII	139
7.3.1	HAP interagiert über ionische Wechselwirkungen mit LHCII	139
7.3.2	LHCII bindet als intakter Komplex an TiO ₂	140
7.3.3	Die TiO ₂ -Oberfläche trägt in wäßriger Umgebung keine positiven Ladungen	142
7.3.4	LHCII ist kein Elektroneninjektor, aber als Teil eines	144

Biomimetischen Modells ein potentieller Sensitizer	
7.3.5 Längerfristige Erhöhung der Energiekonversion in einer Grätzelzelle mit einem biomimetischen Modell aus LHCII und Farbstoff-Elektroneninjektor als Sensitizer	145
7.3.6 Ausblick: weitere Möglichkeiten der technischen Nutzung Biomimetischer Modelle aus LHCII und angekoppeltem Energieakzeptor	147
7.3.6.1 Energieleitungssysteme	147
7.3.6.2 Nutzung des Sonnenlichts zur Energiespeicherung in chemischer Form	149
8. <u>Zusammenfassung</u>	150
9. <u>Anhang</u>	152
9.1 Rechnerische und experimentelle Bestimmung der LHCII-Stoffmenge pro Blattfläche	152
9.2 Ermittlung der potentiellen Energiekonversionseffizienz höherer Pflanzen	152
9.3 Veränderung der Energietransfereffizienz bei Vorlage Mehrerer Donoren oder mehrerer Akzeptoren	153
9.4 Abkürungsverzeichnis	156
9.5 Literaturverzeichnis	158

1. Einleitung

Die Nutzung des Sonnenlichts zur Energiegewinnung ist die wesentliche Voraussetzung für die Existenz nahezu allen Lebens auf der Erde. Ohne die Lichtabsorption der Primärproduzenten (photosynthetische Bakterien und Pflanzen) wäre es vermutlich nie zu einem längerfristigen Aufbau von Biomasse gekommen, welche jetzt die Nahrungsgrundlage für Tier und Mensch darstellt.

Kernstück der pflanzlichen Photosynthese ist die photoinduzierte Ladungstrennung in den Reaktionszentren der Thylakoidmembran. Durch Lichteinstrahlung passenden Energiegehalts kommt es hier zur Anregung von Chlorophyll a (Chla), das nachfolgend ein Elektron an einen Primärakzeptor abgibt. Im Photosystem II (PSII) handelt es sich dabei um Phäophytin. Eine Potentialdifferenz von 1,8V kann hier durch die Nutzung der eingestrahlten Sonnenenergie überwunden werden. Das Elektron wird über die Elektronentransportkette auf NADP^+ übertragen, zurück bleibt das Chlorophyllkation, welches mit Hilfe der Wasserspaltung wieder reduziert wird.

Da die Wahrscheinlichkeit einer direkten Lichtanregung des fraglichen Chla im Reaktionszentrum äußerst gering ist, haben Pflanzen membranintegrale Antennensysteme entwickelt, die die Sonnenenergie auf diese Pigmente fokussieren. Es handelt sich hierbei um Protein-Pigment-Komplexe, die das Licht großer Wellenlängenbereiche absorbieren und nachfolgend auf Chla des Reaktionszentrums übertragen.

Im PSII gliedert sich die Antenne in zwei Teile. Den äußeren Teil stellen Chlorophyll a/b-bindende Proteine (Cab-Proteine) dar. Die von ihnen absorbierte Lichtenergie wird auf den inneren Teil der Antenne übertragen. Hier leiten die Chla-bindenden Proteine CP 47 und CP 43 die Solarenergie zum Reaktionszentrum des PSII weiter.

Ziel dieser Arbeit war die Generierung eines biomimetischen Modells eines solchen Photosystems, bestehend aus einem Lichtsammler und einem Energieakzeptor. Es sollte ein möglichst einfaches Modell sein, an dem die zur letztendlichen Ladungstrennung im pflanzlichen Reaktionszentrum führenden Energietransferwege nachempfunden werden können.

Es wurde dazu mit einem Protein der äußeren Antenne des PSII gearbeitet, dem Hauptlichtsammlerkomplex LHCII („light harvesting complex II“). An dieses Cab-Protein wurden synthetische Farbstoffe angekoppelt, die die vom Lichtsammelprotein absorbierte Lichtenergie aufnehmen und in veränderter Qualität wieder abgeben können. Ziel war es, einen möglichst effizienten, nahezu vollständigen Energietransfer von den Chlorophyllen des LHCII auf die angekoppelten Farbstoffe zu etablieren. Die Farbstoffe sollten ähnlich dem photosynthetischen Reaktionszentrum als Energieakzeptor dienen und nachfolgend diese Energie wieder zugänglich machen.

Die biomimetischen Modelle sollten zur Erforschung des komplexinternen Energietransfers (vgl. Kapitel 1.2) sowie zur Determinierung wichtiger struktureller Eigenschaften des LHCII (vgl. Kapitel 1.1.3) herangezogen werden. Gleichzeitig sollte mit ihrer Hilfe auf eine technische Nutzbarmachung der pflanzlichen Energiegewinnung hingearbeitet werden (vgl. Kapitel 1.4).

Bevor auf die genaue Konstruktion dieser biomimetischen Modelle eingegangen wird, soll der beteiligte Proteinkomplex, LHCII, näher vorgestellt werden.

1.1 Struktur des LHCII

In der äußeren Antenne des PSII sind bislang 6 verschiedene Cab-Proteine (Lhcb-1 bis Lhcb-6) charakterisiert worden (*cf.* Jansson, 1994). Lhcb-1 bis -6 sind kerncodierte Proteine. Sie werden im Cytosol synthetisiert, mit Hilfe eines „Precursor“-peptids in den Chloroplasten transportiert und in die Thylakoide inseriert (*cf.* Jansson, 1994). Hier liegen sie in Form pigmentierter Komplexe vor.

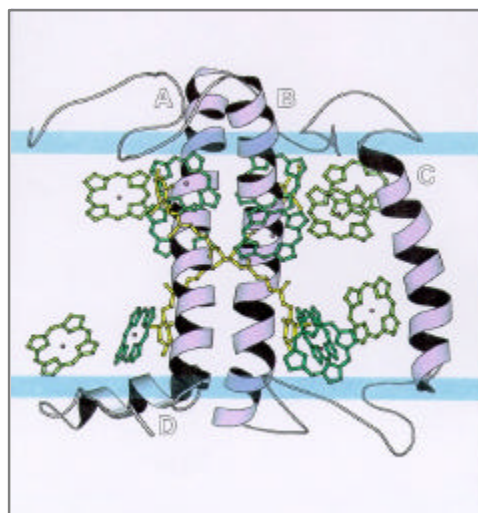
Lhcb-1, -2 und vermutlich auch -3 bilden den Hauptlichtsammelkomplex, LHCII, des PSII. Die Apoproteine besitzen einander vergleichbare Molekulargewichte von 24-29 kDa und stellen ein Drittel allen Proteins der Thylakoidmembran dar. 50% des gesamten Chlorophylls einer Pflanze bindet hier.

Der LHCII liegt nativ in Form von Trimeren vor. Jansson (1994) vermutet die Existenz gemischter Trimere der Proteine Lhcb-1 und -2. Über Lhcb-3 ist diesbezüglich wenig bekannt. Monomeres Lhcb-1 oder -2 findet man in ergrünenden Pflanzen (Dreyfuss und Thornber, 1994), es stellt hier offenbar ein Intermediat bei der Oligomerisierung dar.

1.1.1 Kristallographisch aufgelöste LHCII-Struktur

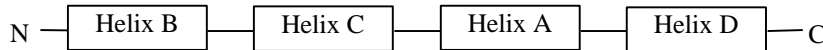
Die räumliche Struktur des LHCII-Monomers konnte durch kristallographische Untersuchungen von Kühlbrandt *et al.* (1994) in einer maximalen Auflösung von 3,4 Å determiniert werden. Zentrale Helixbereiche konnten entschlüsselt, sowie die Position von 12 Chlorophyllen und 2 Xanthophyllen bestimmt werden. Periphere Proteinbereiche, wie der N-terminus oder die Schleifenregionen zwischen den Helices blieben dagegen in ihrer Struktur unklar. Die Auflösungsgrenze von 3,4 Å reichte darüber hinaus nicht aus, zwischen den verschiedenen biochemisch detektierten, Pigmentspezies (Chla und Chlorophyll b (Chlb) oder Lutein und Neoxanthin) zu unterscheiden. Auch die Orientierung der Pigmente im Komplex konnte nicht bestimmt werden.

Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines pigmentierten LHCII-Monomers nach Untersuchungen von Kühlbrandt *et al.* (1994)



Das LHCII-Monomer besitzt drei transmembrane Helices. Eine vierte, amphipathische Helix wurde C-proximal gefunden. Die Benennung und Lage der Helices erfolgt nach Kühlbrandt *et al.* (1994) (vgl. LHCII-Darstellung in Abb. 1.1 und Abb. 1.2):

Abb. 1.2: Benennung der Helices im LHCII



Abfolge der Helices: N-terminus (im Stroma)- **Helix B** (35 Aminosäuren (AS), 51 Å Länge) – **Helix C** (21 AS, 31 Å) - **Helix A** (30 AS, 43 Å) - **Helix D** (10 AS) - **C-Terminus** (im Intrathylakoidraum)

Helix B und A sind in entgegengesetzter Richtung um jeweils 32° zur Membrannormalen geneigt und bilden damit in der Seitenansicht ein Kreuz (vgl. Abb. 1.1). Zwei Ionenpaare, bestehend aus je einem Arginin und Glutamat, verknüpfen an der Kreuzungsstelle die beiden Helices, eine maximale Annäherung auf 8,5 Å erfolgt hier. Helix C besitzt eine deutlich geringere Neigung zur Membrannormalen von 9° .

Das Glutamat der Ionenpaare, wie auch weitere Glutamin-, Asparagin- und Histidin-Gruppen sind vermutlich mitverantwortlich für die Chlorophyllbindung an das Proteingerüst. Die Aminosäuren interagieren über ihre polaren Seitenketten mit dem zentralen Magnesiumatom der Pigmente. 8 solcher Seitenkettenliganden wurden gefunden, die übrigen Chlorophylle wechselwirken nach Meinung Kühlbrandts (Kühlbrandt *et al.*, 1994) vermutlich indirekt über ein Wassermolekül mit den Carbonylgruppen der Polypeptidkette.

Kristallographische Chlorophyllzuordnung

Mittels biochemischer Untersuchungen wiesen Kühlbrandt *et al.* (1994), Connelly *et al.* (1997) und weitere Forscher im LHCII ein Verhältnis von Chla zu Chlb von 1,3-1,4 nach. Kühlbrandt *et al.* (1994) folgerten daraus das Auftreten von 7 Chla und 5 Chlb pro LHCII-Monomer. Die Pigmentspezifizierung der kristallographisch aufgelösten Porphyrinsysteme erklärten sie über die Notwendigkeit einer Löschung langlebiger Chla-Triplettzustände im Komplex. Xanthophylle können von Chla im Elektronenaustauschmechanismus (nach Dexter, vgl. Kapitel 1.2) angeregte Triplettenergiezustände übernehmen und in Form von Wärme freisetzen, vorausgesetzt der Abstand zwischen beiden Pigmentspezies beträgt nicht mehr als 5 Å (van Grondelle, 1985). Genau 7 Chlorophylle erfüllen diese Vorgabe im Komplex, es mußte sich nach Ansicht Kühlbrandts daher um Chla handeln. Chlb transferiert seine Anregungsenergie zu schnell auf Chla (vgl. Kapitel 1.2), als daß es zur Ausbildung von angeregten Triplettzuständen kommen könnte.

Diese Meinung ist nicht unumstritten, weder bezüglich der genauen Chlorophyllanzahl noch bezüglich deren Position und Orientierung im Komplex besteht in der Fachwelt Einigkeit. So detektierten Croce *et al.* (2001) z.B. einen Energietransfer von Lutein auf Chlb im Bereich von 50 fs (vgl. Kapitel 1.2), was nur bei einem sehr geringen Chromophorenabstand möglich ist. Eine ausschließliche Besetzung der luteinnahen Chlorophyllbindestellen durch Chla wurde damit ausgeschlossen.

Kristallographische Carotinoidzuordnung

Die Carotinoidzuordnung nach Spezies und Bindungsort ist im LHCII deutlich weniger umstritten als die Chlorophyllzuordnung. Durch biochemische Untersuchungen von Lee und Thornber (1995) wurden 6 Luteine, 2 Neoxanthine und 1 Violaxanthin pro Trimer nachgewiesen. Die von Kühlbrandt *et al.* (1994) kristallographisch detektierten 2 Xanthophylle pro Monomereinheit werden deshalb in der Regel als Lutein gedeutet. Sie liegen im Komplexinneren

und sind, ähnlich den Helices A und B, in entgegengesetzter Richtung in einem Winkel von 50° zur Membrannormalen geneigt. An ihrer Überkreuzungsstelle nähern sie sich auf 11 Å. Ihnen wird ein stabilisierender Effekt auf die Proteinstruktur des LHCII zugeschrieben, desweiteren sind sie für das Quenching langlebiger Chla-Triplettzustände essentiell.

1.1.2 *in vitro*-Rekonstitution

In dieser Arbeit wurde mit dem bakteriell überexprimierten Apoprotein Lhcb-1 des LHCII gearbeitet. Größter Vorteil der Nutzung des rekombinanten Proteins gegenüber der nativen, aus der Pflanze isolierten, Form war die leichtere Modifizierbarkeit der AS-Sequenz auf DNA-Ebene. So wurden AS zur ortsspezifischen, selektiven Kopplung eines Energieakzeptors an das Lhcb-1 oder aber für eine definierte Proteinimmobilisierung zur Nutzung der LHCII-Energiefallenkonstrukte inseriert.

Lhcb-1 ist im nativen LHCII das dominierende Protein. Es ist nach Jansson (1994) vermutlich das häufigste Membranprotein der Erde. Die meisten Pflanzen besitzen mehrere *lhcb-1*-Gene, die für Proteine einer Länge von ca. 232 AS codieren. Ein *lhcb-1*-Gen von *Pisum sativum* (AB 80) wurde in unserer Arbeitsgruppe in einen Expressionsvektor der pDS12-Reihe einligiert und ein *E.coli*-Stamm damit transformiert. Das Gen steht unter der Kontrolle des Lac-Operators und kann daher durch die Zugabe des Galaktose-Analogons IPTG (Isopropylthiogalaktosid) zur Expression gebracht werden. Das Protein wird im Bakterium in Form von Einschlußkörpern abgelagert und kann daraus extrahiert werden.

Um aus dem bakteriell exprimierten Lhcb-1 intakte LHCII-Komplexe zu generieren, ist eine Renaturierung des Lichtsammelproteins notwendig. Eine Rückfaltung erfolgt unter Zugabe der im nativen LHCII gebundenen Pigmente Chla, Chlb, sowie den Xanthophyllen Lutein, Neoxanthin und Violaxanthin. Man spricht von der *in vitro*-Rekonstitution (vgl. Kapitel 3.2.2).

Struktur und Funktionen des *in vitro* hergestellten LHCII gleichen nach bisherigen Messungen dem nativen Komplex weitestgehend. Kristallographische Untersuchungen von Hobe *et al.* (1994) am rekombinanten Trimer zeigten keinerlei Unterschiede zum nativen Trimer. Komplexinterne Energietransferprozesse (fluorometrisch von Paulsen *et al.*, 1990 bestimmt) sowie excitonische Kopplungen der Chlorophylle untereinander (mit Hilfe von Untersuchungen zum Circular-Dichroismus bestimmt, Paulsen *et al.*, 1993) gleichen den für den nativen Komplex bestimmten Daten.

Aber nicht nur für die Experimente dieser Arbeit zur Generierung des biomimetischen Modells eines Photosystems war die Nutzung der rekombinanten Lichtsammelkomplexe von Vorteil. Auch für die genauere Carotinoid- und Chlorophyllzuordnung sowie deren mögliche Orientierung im LHCII wurde das bakteriell exprimierte Protein verwendet.

Dazu wurde die AS-Sequenz an potentiellen Pigmentbindestellen modifiziert und eine mögliche Veränderung der Chlorophyll- und Carotinoidzusammensetzung im Komplex nachfolgend photometrisch quantifiziert. Neben unserer Arbeitsgruppe arbeiten R.Bassi *et al.* (z.B. Croce *et al.*, 1999) sowie W.Kühlbrandt *et al.* (z.B. Rogl *et al.*, 1999) mit dieser Methode. Da es auf diese Weise gelang, die Pigmentzuordnung von Kühlbrandt *et al.* (1994) zu erweitern, zu manifestieren, aber teilweise auch zu revidieren, sollen die Ergebnisse hier kurz dargelegt werden.

Carotinoidzuordnung in rekombinanten Komplexen

Von nahezu allen Forschern wurden neben Lutein auch Neoxanthin und in geringeren Mengen auch Violaxanthin im LHCII detektiert. Eine Neoxanthinbindestelle konnte kristallographisch nicht nachgewiesen werden. Untersuchungen von Croce *et al.* (1999) legten jedoch die Anwesenheit einer solchen Bindestelle nahe. In Punktmutanten des rekombinanten LHCII-Monomers konnte ein Verlust dieses Carotinoids durch AS-Austausch auf der Helix C induziert werden. Die Autoren gehen aufgrund dieser und weiterer spektroskopischer Untersuchungen von einer Neoxanthinbindestelle zwischen Helix C und den gekreuzten Helices A/B aus.

Die von Lee und Thornber (1995) gefundene stöchiometrische Carotinoidzusammensetzung von 6 Luteinen, 2 Neoxanthinen und 1 Violaxanthin pro Trimer ist daher vermutlich nicht als absolut anzusehen. Existiert in jedem LHCII-Monomer eine Neoxanthinbindestelle, kann sie potentiell auch besetzt werden, was zu einem maximalen Neoxanthingehalt von 3 Molekülen pro LHCII-Trimer führt (Ruban *et al.*, 1999).

Chlorophyllzuordnung in rekombinanten Komplexen

In Punktmutanten des LHCII, die eine genetische Veränderung an einer potentiellen Chlorophyllbindestelle trugen, wurden Veränderungen im Gesamtchlorophyllgehalt detektiert. Rückschlüsse auf die Pigmentbindung in der veränderten Proteinregion wurden damit möglich. Für viele Chlorophylle wurden die Postulate von Kühlbrandt *et al.* (1994) bestätigt (*cf.* van Amerongen und van Grondelle, 2001). Für zwei als Chlb bindend postulierte AS (Bindung von Chlb1 und Chlb3, Nomenklatur nach Kühlbrandt *et al.*; 1994) wurden dagegen verstärkt Hinweise auf eine Chla-Kopplung gefunden (Remelli *et al.*, 1999; Rogl *et al.*, 1999).

Insgesamt läßt aber auch diese Methode bislang keinen letztendlichen Beweis der Pigmentzuordnung zu. Zum einen kam es durch einzelne Punktmutationen häufig zum Verlust von mehr als einem Chlorophyll (vgl. z.B. Yang *et al.*, 1999, Mutation der Chla5-Bindestelle führte zum Verlust von mehr als 3 Chlorophyllen). Zum anderen wurde in den Punktmutanten häufig ein substöchiometrischer Verlust von Chla und Chlb nachgewiesen, was die Determination der im nativen Komplex gebundenen Pigmentspezies zusätzlich erschwerte.

Vermutlich bindet nicht jedes Chlorophyll an eine spezifische AS (vgl. Remelli *et al.*, 1999), auch indirekte Proteinkopplungen über Pigment-Pigment-Interaktionen sind möglich und schon von Kühlbrandt *et al.* (1994) postuliert worden. Daneben wurde in letzter Zeit häufiger die Frage nach der Ausschließlichkeit der Zuordnung einer Chlorophyllspezies pro Pigmentbindestelle gestellt. Zwar wurde bislang an nativem LHCII immer ein konstantes Chla/b-Verhältnis detektiert, Versuche von Fey (2001) oder Kleima *et al.* (1999) zeigten jedoch bei rekombinanten Komplexen je nach Versuchsbedingung starke Variationsmöglichkeiten in der Bindung von Chla und Chlb.

Neben den Unsicherheiten in der Pigmentzuordnung im LHCII blieben nach den kristallographischen Untersuchungen von Kühlbrandt *et al.* (1994), wie schon eingangs erwähnt, auch Fragen bezüglich der Proteinstruktur bestehen. Eine dieser Fragestellungen wurde im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet und soll daher hier vorgestellt werden.

1.1.3 Struktur und Funktion des N-terminus

Der N-terminale Teil des LHCII ist von großer funktioneller Bedeutung bei der Assemblierung der LHCII-Trimere sowie bei der Regulation der den Reaktionszentren zur Verfügung stehenden Anregungsenergie. Da von diesem Proteinbereich strukturell keinerlei Informationen vorlagen (s.u.), sollten in dieser Arbeit die biomimetischen Modelle aus LHCII und ange-

koppeltem Farbstoff zur Charakterisierung des Proteinbereichs herangezogen werden. Dazu sollte die externe Energiefalle an den N-terminus oder in direkter Nachbarschaft zum N-terminus (vgl. Kapitel 3.1) positioniert werden. Ziel war es, über Energietransfereffizienzen von Chl_a auf den Farbstoff einen Einblick in die molekularen Abstände von Donor und Akzeptor zu erhalten und damit Strukturvorhersagen zu treffen (vgl. Kapitel 1.5).

Der N-terminus ragt aus der Thylakoidmembran ins Stroma. Im Lhcb-1 des AB 80 Gens beträgt seine Länge 55 Aminosäuren (ein Teil der membrandurchspannenden Helix B soll nach Cammarata und Schmidt (1992) und Karlin-Neumann *et al.* (1985) auch aus der Membran ragen, wird aber im folgenden nicht zum N-terminus gerechnet).

Für die fehlende kristallographische Auflösung dieses Proteinbereichs in den Untersuchungen von Kühlbrandt *et al.* (1994) können folgende Szenarien angenommen werden.

- a.) Der N-terminus besitzt keine determinierte, in jedem Protein in gleicher Weise eingenommene Struktur.
- b.) Der N-terminus unterliegt umgebungsabhängig Konformationsänderungen.
- c.) Kristallographisch untersuchte, native LHCII-Trimere setzen sich aus Lhcb-1, Lhcb-2 und eventuell Lhcb-3 zusammen. Die Proteine zeigen in den peripheren Proteinbereichen geringere Sequenzhomologie als im Bereich der transmembranen Helices. Die Auf Lösungsschwierigkeit könnte daher in der Proteinheterogenität begründet sein.

Während für Szenario c.) keine gesicherten Erkenntnisse bezüglich Strukturinhomogenitäten von Lhcb-1 bis -3 vorliegen, gibt es für Szenario b.) einige Hinweise.

So fanden Nilsson *et al.* (1997) an synthetischen Peptiden einer Sequenz von 15 AS gleicher Abfolge wie im Lhcb-1 (vgl. Kapitel 2.3, im synthetischen Peptid ohne Methionin als 1. AS) eine Veränderung der Peptidstruktur nach Phosphorylierung des Threonins an Position 5. Es ist schon seit längerer Zeit bekannt, daß LHCII auch in der Thylakoidmembran an dieser oder der darauffolgenden Aminosäure (Thr6) phosphorylierbar ist und daß diese Phosphorylierung in einem engen Zusammenhang mit den „state-transition“-Prozessen (Auswandern des LHCII in stromale Thylakoidbereiche zur Verkleinerung der PSII-Antenne) steht (Allen, 1992). Nilsson *et al.* (1997) fanden nach Phosphorylierung eine signifikante Zunahme der α -Helikalität in ihrem Peptid.

Zer *et al.* (1999) unterstützten die Hypothese einer N-terminalen Konformationsänderung durch Untersuchungen am nativen LHCII. Sie postulierten eine lichtinduzierte strukturelle Umgestaltung des fraglichen Proteinabschnitts, da sie an isolierten Komplexen nach Bestrahlung eine deutlich erhöhte Phosphorylierbarkeit im Dunkeln detektierten. Sie folgerten daraus eine mögliche Konformationsänderung des Proteinbereichs zur besseren Exposition der Phosphorylierungsstellen. Diese These wurde durch einen Trypsinverdau unterstrichen. Trypsin ist eine Protease, welche im intakten LHCII nur 35 Aminosäuren des N-terminus verdaut (Paulsen *et al.*, 1993), der übrige Teil des Proteins ist proteasesgeschützt. Nach Lichteinwirkung auf den Komplex konnte eine deutlich erhöhte Trypsinverdaueffizienz gezeigt werden, was auch auf eine strukturelle Umgestaltung dieses Bereichs hindeutete.

Aber auch die Trimerisierung von LHCII-Monomeren scheint eine strukturelle Veränderung des N-terminus zu induzieren. So konnten in Farbstoffkopplungsversuchen von Huschenbett (2001) N-terminale Proteinbereiche im Monomer besser markiert werden als im Trimer. Es wurde daher bei den Monomeren von einer stärkeren Exposition der markierbaren AS ausgegangen. Die eingenommene N-terminale Konformation könnte hier eine größere Interaktionsmöglichkeit des Proteinabschnitts mit dem umgebenden, farbstoffhaltigen Medium bewirken.

Damit ist es wahrscheinlich, daß Szenario b.) zur geringen kristallographischen Auflösung des N-terminalen Proteinbereichs (Kühlbrandt *et al.*, 1994) beitrug. Szenario a.) dagegen mutet

nach obigen Informationen zu definierten Konformationsänderungen eher unwahrscheinlich an. Es ist darüber hinaus schwer vorstellbar, daß ein so bedeutungsvoller Teil des LHCII keine definierte Struktur haben sollte.

Neben seinem Beitrag zum Prozeß der „state-transition“ ist dieser Proteinteil noch in mindestens dreifacher Hinsicht wichtig. So zeigten Versuche von Reinero und Tobin (1991), daß bei fehlendem N-terminus kein korrekter Proteinimport durch die Chloroplastenhüllmembranen erfolgen konnte.

Auch bei der Assemblierung der Trimerstruktur ist die Anwesenheit des N-terminus essentiell. Fehlten in Versuchen von Hobe *et al.* (1995) mit dem rekombinanten Protein die Aminosäuren 16-21 des Lhcb-1, fand keine Oligomerisierung statt. Auch die für die Trimerisierung essentielle Bindung von Phosphatidylglycerol ging verloren (Nußberger *et al.*, 1993).

Versuche von Yang *et al.* (2000) zeigten darüber hinaus die Notwendigkeit eines verfügbaren N-terminus als Angriffspunkt pflanzenendogener Proteasen. So konnten LHCII-Monomere nur in Anwesenheit ihres N-terminus verdaut werden. Proteinmutanten, denen die ersten 58 Aminosäuren fehlten, wurden von der Protease vermutlich nicht erkannt.

Interessanterweise scheint dieser Proteinteil jedoch für die Pigmentbindung nicht essentiell zu sein. Experimente von Paulsen und Hobe (1992) und Cammarata und Schmidt (1992) demonstrierten an rekombinantem LHCII, daß auch nach Deletion des gesamten N-terminus auf molekularer Ebene sowie eventuell des aus der Membran ragenden Teils der Helix B (unterschiedliche Ergebnisse in beiden Veröffentlichungen) eine *in vitro*-Rekonstitution von monomeren LHCII möglich ist.

Das war eine wesentliche Voraussetzung für die Versuche dieser Arbeit, in denen zur strukturellen Untersuchung dieses Proteinbereichs mit unterschiedlich N-terminal verkürzten Mutanten des LHCII gearbeitet wurde (vgl. Kapitel 1.5).

1.2 Energietransferprozesse

Ein wesentliches Augenmerk dieser Arbeit war auf Energietransferprozesse gerichtet, Energietransferprozesse innerhalb des LHCII und von ihm auf mögliche Energieakzeptoren in den biomimetischen Modellen. Daher soll hier zunächst eine kurze Einführung in die beiden photosynthetisch relevanten Energietransferprozesse gegeben werden, um daran anschließend bislang erforschte Energieübergänge im LHCII zu präsentieren.

1.2.1 Resonanz-Energietransfer (RET) nach Förster

Beim RET handelt es sich um einen induzierten Dipolmechanismus. Die elektronische Anregung eines Donormoleküls wird durch ein sog. Übergangsdipolmoment (μ_D) charakterisiert. μ_D kann mit einem entsprechenden Übergangsdipolmoment (μ_A) eines Akzeptormoleküls in Wechselwirkung treten, wenn hier ein (nicht verbotener) elektronischer Übergang gleicher Frequenz existiert. Man spricht vom Resonanztransfer.

Die Wechselwirkung zwischen Energiedonor und Energieakzeptor hängt von der Orientierung der Dipole (μ_D und μ_A) und ihrem Abstand voneinander (R) ab. Von besonderer Bedeutung ist die Abhängigkeit des Energieübergangs von R . Die quantenmechanische Behandlung ergibt für die entsprechende Ratenkonstante (k_{ET}) den Ausdruck (vereinfacht, nach Turro, 1978):

$$k_{ET} = \text{Konstante} \cdot \mu_A^2 \times \mu_D^2 / R^6$$

D.h. k_{ET} nimmt hier bei zunehmendem R in der 6. Potenz ab.

Für den RET existiert als weitere wichtige Größe Försters kritischer Abstand (R_0). Dieser gibt an, bei welchem R nur noch die Hälfte der vom Donor absorbierten Energie auf den Akzeptor übertragen wird (vgl. Kapitel 4.1.3). Charakteristisch für den RET ist, daß keine überlappenden Elektronenwolken zwischen Donor und Akzeptor für den Übergang erforderlich sind. Ein Energietransfer kann über Distanzen bis zu 10 nm erfolgen.

Voraussetzung für den RET sind daher nur eine spektrale Überlappung der Donoremission und der Akzeptorabsorption, eine möglichst gute Dipol-Dipol-Orientierung (im Optimalfall parallel zueinander) und ein $R < 10$ nm (der potentielle Maximalwert von R , der noch zu einem signifikanten Energietransfer führt, ist abhängig von den ersten beiden Bedingungen).

1.2.2 Energietransfer nach dem Dextermechanismus

Um diesen Mechanismus zu ermöglichen, dürfen Donor und Akzeptor keinen größeren Abstand als die Summe ihrer beiden Van-der-Waals-Radien zueinander haben. D.h. Donor und Akzeptor müssen einander so nahe sein, daß ihre Elektronenorbitale überlappen. Im Überlappungsbereich kommt es zum Elektronenaustausch, so daß nach Lichtabsorption die Anregungsenergie über Donor und Akzeptor delokalisiert vorliegt. Man spricht von einer starken Kopplung. Im Gegensatz zum RET ist hier die Orientierung der am energetischen Übergang beteiligten Chromophore unbedeutend.

Die Gleichung zur Bestimmung der Ratenkonstante k_{ET} lautet hier (Turro, 1978):

$$k_{ET} = K \times J \times \exp(-2R/L)$$

K = Orbitalüberlappung

J = Spektrale Überlappung von Donor (D) und Akzeptor (A)

L = Summe der Van-der-Waals-Radien von D und A

k_{ET} nimmt im Unterschied zum RET mit zunehmendem R sogar exponentiell ab. Dies ist die Folge der zum Energietransfer notwendigen Elektronenorbitalüberlappung. Die Elektronendichte verringert sich auch im einzelnen Atom exponentiell mit wachsendem Abstand zum Atomkern.

Sichtbar wird ein Energietransfer nach Dexter durch das Auftreten neuer Absorptionsbanden zusätzlich zu den singulären Absorptionsbanden der beteiligten Chromophore.

Große Bedeutung besitzt diese Form des Energietransfers bei sehr engem Kontakt der am Energietransfer beteiligten Moleküle und dann besonders, wenn der RET als dipolverboten gilt.

1.2.3 Energietransferwege im LHCII

Im LHCII-internen Energietransfer ist wahrscheinlich RET dominierend. Energieübergänge nach dem Dextermechanismus können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

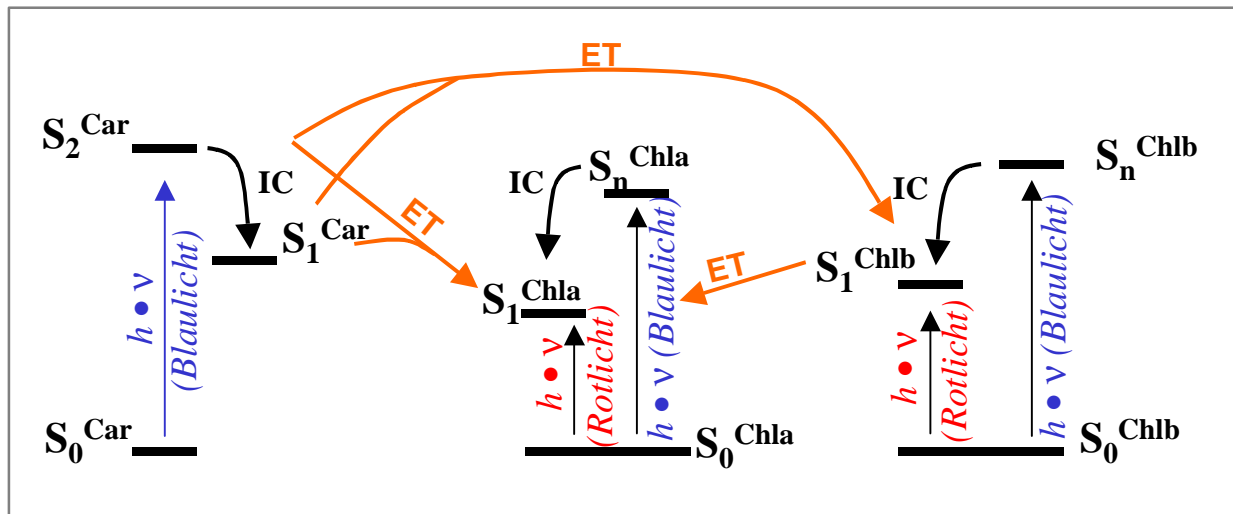
Die Lichtabsorption des Komplexes wird durch seine Pigmente Chla, Chlb, Lutein, Neoxanthin und Violaxanthin bestimmt. In organischem Lösungsmittel zeigt jede Pigmentspezies ein charakteristisches Absorptionsverhalten. Eine Unterscheidung einzelner Pigmentmoleküle innerhalb dieser Spezies ist nicht möglich. Einzelne proteingebundene Pigmentmoleküle weisen dagegen spektroskopisch unterscheidbare Absorptionsbanden auf. Dies ist potentiell auf zwei Phänomene zurückzuführen. Zum einen ist die Proteinumgebung für verschiedene Chromophore differierend und kann das Absorptionsverhalten verändern. Zum anderen können excitonische Kopplungen der Pigmente untereinander die Absorption verändern. Für die Chlorophylle des LHCII konnten bislang von den meisten Forschern keine starke excitonischen Wechselwirkungen nachgewiesen werden (s.u., vgl. z.B. Pieper *et al.*, 1999). Daher wird hier die Proteinumgebung für die variierende Chlorophyllabsorption in deutlich stärkerem Maße verantwortlich gemacht. So fanden Nußberger *et al.* (1994) in 77K Absorptionsmessungen an LHCII-Trimeren für Chla und Chlb je eine Hauptabsorptionsbande im Q_y -Bereich. Dieser Bande konnten jeweils mindestens fünf Subbanden zugeordnet werden.

Der LHCII-interne Energietransfer erfolgt vorwiegend im Femtosekunden- bis Picosekundenbereich. Man unterscheidet vier verschiedene Energieübergänge:

- Energietransfer von den Carotinoiden auf Chla und Chlb
- Energietransfer zwischen verschiedenen Chlb-Molekülen
- Energietransfer von Chlb nach Chla
- Energietransfer zwischen verschiedenen Chla-Molekülen

Abb. 1.3 verdeutlicht dieses Szenario graphisch.

Abb. 1.3: Energietransfermechanismen im LHCII



ET = Energietransfer
 IC = Interne Konversion
 S = Singulett-Niveau

Car = Carotinoid
 Chl = Chlorophyll

Die wichtigsten energetischen Übergänge innerhalb des LHCII sind hier gezeigt. Es wurde darauf verzichtet, Energietransferprozesse von den Chlorophyllen auf die Carotinoide darzustellen, wie sie im Zusammenhang mit dem nicht-photochemischen Quenching auftreten. Darüber hinaus sind die Übergänge innerhalb einer Pigmentspezies nicht eingezeichnet.

Besonders schnelle Energietransferereignisse wurden für den Übergang von Chlb nach Chla gefunden. So wurde in Raumtemperaturmessungen zur transienten Absorption eine ultrakurze Transferzeit von ~150-200 fs detektiert, weitere gefundene Halbwertszeiten für den Übergang waren ~500-650 fs und ~5-7ps (Connelly *et al.*, 1997; Trinkunas *et al.*, 1997; Kleima *et al.*, 1997). Croce *et al.* (2001) konnten diese Halbwertszeiten nur zum Teil bestätigen. Statt der 500-600 fs wurden hier zwei Lebenszeiten von 330 fs und ca. 1 ps detektiert. Daher wurde die zuvor gemessene Übergangszeit als eine Überlagerung der beiden neu detektierten Transferzeiten interpretiert.

Der Energietransfer zwischen verschiedenen Chla-Molekülen wurde vielfach als langsamer erachtet, so fanden Kleima *et al.* (1997) und Visser *et al.* (1996) Halbwertszeiten von einer Picosekunde und mehr. Gradinaru *et al.* (1998) sahen neben diesen vergleichsweise langsamen Übergängen auch Halbwertszeiten im Femtosekundenbereich. In transienten Absorptionsmessungen bei 77K wurden für den Energietransfer zwischen Chla-Molekülen im Monomer fünf Übergangszeiten gemessen. Für den Energietransfer von Chlorophyllen der maximalen Absorption von 670 nm zu Chlorophyllen der 680 nm-Absorption wurde eine Transferzeit von 300 fs ermittelt (eine zweite Transferzeit von 12 ps konnte ebenfalls gemessen werden). Ähnlich schnell mit 450 fs wurde der Energietransfer zwischen den langwelligst absorbierenden Chlorophyllen bestimmt. Hier existierte jedoch noch eine zweite Komponente von 7,5 ps. Für den Übergang von Chla der 663 nm Bande zu Chla der ~680 nm Bande wurden 5 ps veranschlagt. Damit wurde ähnlich Connelly *et al.* (1997) die Existenz dreier Chla-Pools bestätigt, jedoch mit etwas abweichenden Absorptionsmaxima von 663 nm, 670 nm und 680 nm sowie Halbwertszeiten des Energietransfers von einigen Hundert Femtosekunden, 5 - 7,5 ps und >10 ps.

Mittlerweile konnte auch ein Chlb-interner Energietransfer von Agarwal *et al.* (2000) im Bereich von unter einer Picosekunde nachgewiesen werden.

Während für den chlorophyllinternen Energietransfer weitgehend Einigkeit darüber besteht, daß nur ein Übergang vom ersten angeregten Singulettzustand aus möglich ist, differieren die Meinungen diesbezüglich beim Carotinoid-Chlorophyll-Übergang. Postuliert wird neben einem Energietransfer ausgehend vom ersten Singulettniveau ein Übergang ausgehend vom zweiten.

Jennings *et al.* (1996) warfen die Möglichkeit eines Energietransfers vom S_2 -Niveau auf. Zwar wußte man, daß die Energiekonversion von S_2 zu S_1 im Bereich von 150 - 300 fs erfolgt, es konnte jedoch im gleichen Zeitfenster auch ein Carotinoid-Energietransfer auf die Chlorophylle detektiert werden. Gerade für langwellig absorbierende Carotinoide wie Lutein oder β -Carotin könnte der Energiegehalt des S_1 -Niveaus für einen Transfer auf die Chlorophylle nicht ausreichend sein, so daß sich nur die Möglichkeit eines effizienten Übergangs vom S_2 -Niveau ergeben würde.

Die neueste Arbeit zu diesem Thema stammt von Gradinaru *et al.* (in press). Sie fanden für Carotinoide eine Lebenszeit von 80-120 fs auf dem S_2 -Niveau. 60-65% der Anregungsenergie könnten in dieser Zeit auf die Chlorophylle übertragen werden, der Rest durch interne Konversion zum S_1 -Niveau relaxieren. Damit postulieren die Forscher einen Carotinoid-Chlorophyll-Übergang ausgehend vom Carotinoid- S_1 - und S_2 -Niveau.

Neben der Donorexitation steht beim Carotinoid-Chlorophyll-Energietransfer auch der erste Energieakzeptor zur Diskussion. Gradinaru *et al.* (in press) postulieren für den Übergang im Lhcb-4 (CP29) Chla als einzigen Energieakzeptor. Im LHCIIF trifft dies ihrer Meinung nach nur für den Transfer ausgehend von Lutein und Violaxanthin zu, Neoxanthin relaxiere durch Energietransfer auf Chlb.

Croce *et al.* (2001) detektierten in Übereinstimmung einen Energietransfer über einen initialen Energieübergang auf Chlb und von dort aus weiter auf Chla (50% aller Übergänge nach diesem Muster detektiert). Es wurden drei verschiedene, an diesem Übergang beteiligte Chlb detektiert. Als Halbwertszeiten der transienten Absorption wurden 50 fs und 70 fs für den Übergang ausgehend von Lutein und 90 fs ausgehend von Neoxanthin gemessen.

Möglicherweise entschärfen diese Befunde zum simultanen Energietransfer auf Chla und Chlb zurückliegende Streitpunkte, in denen die Ausschließlichkeit eines Transferwegs angenommen wurde (Petermann *et al.*, 1997 und Connelly *et al.*, 1997).

Eine dritte Unwägbarkeit im Carotinoid-Chlorophyll-Übergang stellt das generelle Übertragungsprinzip dar. Möglich wäre ein Energietransfer nach Dexter. Die dafür erforderliche Nähe von maximal 5 Å ist für einige Carotinoid-Chlorophyll-Paare erfüllt. Aber auch ein Energietransfer nach Förster kann nicht ausgeschlossen werden. Zwar ist der Übergang vom S_1 -Niveau nach diesem Mechanismus dipolverboten, es kann aber nach Meinung Jennings *et al.* (1996) nicht ausgeschlossen werden, daß ein solcher Energietransfer ausgehend vom S_2 -Niveau stattfindet.

Für den Energietransfer unter den Chlorophyllen wird von vielen Forschern dem RET gegenüber dem Dextertransfer eine größere Bedeutung zugesprochen. Van Amerongen und van Grondelle (2001) erachten eine starke excitonische Kopplung zwischen den Pigmenten aus mehreren Gründen als weniger wahrscheinlich. Zum einen führten Sie Modellberechnungen zur Kopplungsstärke benachbarter Chlorophylle im LHCIIF durch. Die dazu notwendigen Dipolorientierungen der Chlorophylle wurden dem hypothetischen Modell Gradinarus (Gradinaru *et al.*, 1998) entnommen, die Chla und Chlb-Zuordnung erfolgte aus den Bindungsergebnissen der LHCIIF-Punktmutanten (vgl. Remelli *et al.*, 1999; Rogl *et al.* 1999; Yang *et al.*, 1999, vgl. Kapitel 1.1).

Es wurden für Chla/b-Paare Kopplungsstärken bis zu $\sim 120 \text{ cm}^{-1}$ errechnet. Diese liegen damit deutlich unter dem energetischen Unterschied der Chla- und Chlb- Q_y -Energieniveaus ($\sim 450 \text{ cm}^{-1}$). Als Schluß daraus folgerten van Amerongen und van Grondelle, daß die Anregungsenergie weitestgehend auf jeweils einem Chlorophyllpartner lokalisiert sein muß und ein Energietransfer am ehesten mit Hilfe der Förstergleichungen nachvollzogen werden kann. Für Chla/a-Paare wurden maximale Kopplungsstärken von $\sim 87 \text{ cm}^{-1}$ errechnet. Auch hier wurde aus den gleichen Überlegungen eine Lokalisation der Anregungsenergie auf dem einzelnen Pigment gefordert. Lediglich für Chla-Moleküle, die in ultraschnelle Energietransferprozesse ($< 1 \text{ ps}$) involviert sind, könnte eine stärkere excitonische Kopplung eine Rolle spielen.

Darüber hinaus postulieren die Forscher, daß eine starke excitonische Kopplung zwischen Chla-Molekülen zu einem Verschieben der Anregungszustände zu energieärmeren Wellenlängen führen müßte, wie es im LH2 (der Lichtsammelantenne photosynthetisch aktiver Bakterien) auftritt, im LHCII aber nicht in diesem Maße nachgewiesen wurde.

Schließlich sollte im Fall einer starken excitonischen Kopplung auch die Energieäquilibrierung im LHCII deutlich schneller erfolgen als gemessen. Als Zeitfenster wurden ungefähr 30 ps für das Trimer genannt. Andere Lichtsammelsysteme, wie das des PSI-Reaktionszentrums, besitzen Zeitkonstanten von 23-24 ps bei einer 4-fach größeren Pigmentzahl (Savikhin *et al.* 1999).

Leupold *et al.* (1999) stellen dagegen den Energietransfer mit ausschließlich schwach gekoppelten Pigmenten in Frage. Sie erachten ein Auftreten starker excitonischer Kopplungen zwischen Chla-Molekülen als wahrscheinlich und postulieren deshalb ein Delokalisation der Anregungsenergie über 3-6 Chla (Postulat mittlerweile eingeschränkt, mündliche Mitteilung von C.Tietz).

Während die Energietransferprozesse ausgehend von den Carotinoiden in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, spielte der Energieübergang zwischen den Chlorophyllen eine tragende Rolle. So wurde der Energietransfer von Chlb nach Chla als Maß für die Stabilität der biometrischen Modelle verwendet. Es konnte auf diese Weise die Intaktheit des beteiligten Lichtsammlers LHCII überprüft werden.

In einzelmolekularen Untersuchungen wurde nach Chlb-Anregung der Polarisationsgrad der Chla-Fluoreszenz gemessen und damit Rückschlüsse auf den komplexinternen Energietransfer gezogen.

1.3 LHCII-Farbstoff-Konstrukte

Ziel der Arbeit war die Erstellung eines biomimetischen Modells eines pflanzlichen Photosystems aus LHCII und angekoppeltem Energieakzeptor sowie die Vorbereitung einer möglichen technischen Nutzung des Konstrukts.

Untersuchungsobjekt war der rekombinante LHCII (vgl. 1.1), an den verschiedene Farbstoffe als externe Energieakzeptoren kovalent gebunden wurden. Die Farbstoffe wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt.

1.) Lichtabsorption im Nahen-Infrarot-Bereich (NIR-Bereich):

Um die Anregungsenergie der Chlorophylle übernehmen zu können, ist eine Farbstoffabsorption ≥ 680 nm notwendig.

2.) Fluoreszenz langwelliger als die von Chla im LHCII:

Um den Energietransfer von Chla auf den Farbstoff quantifizieren zu können, muß die Fluoreszenz des Energieakzeptors deutlich unterscheidbar von der des LHCII sein (≥ 700 nm). Ein großer energetischer Abstand zwischen Farbstoffabsorption und -emission (Stokes-Shift) ist dabei von Vorteil.

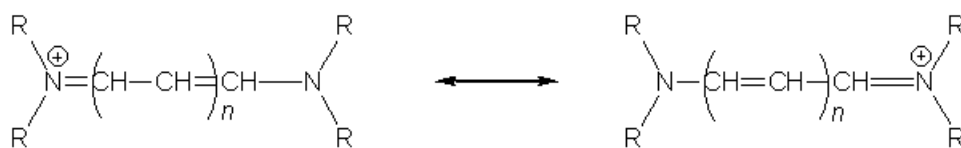
1.3.1 Charakteristika der eingesetzten Farbstoffe

Es wurden NIR-Farbstoffe zweier chemischer Klassen eingesetzt. So wurde zum einen mit drei Cyaninderivaten gearbeitet, zum anderen wurde Benzoylterrylendicarboximid (BTI) genutzt, ein Farbstoff der Rylenklasse.

Cyanine

Cyaninfarbstoffe gehören zur Klasse der Polymethinfarbstoffe. Polymethine sind zumeist lineare, ungesättigte π -Elektronensysteme, oft mit heterosubstituierten Endgruppen:

Abb. 1.4: mesomere Grenzstrukturen des Polymethingerüsts



aus http://www.theochem.uni-duisburg.de/THC/research/hauptteil_cyanines.html

Cyanine bilden eine der Unterklassen der Polymethine und sind charakterisiert durch die Anwesenheit von stickstoffhaltigen Gruppen, angelagert an die Polymethinkette (vgl. Abb. 1.4).

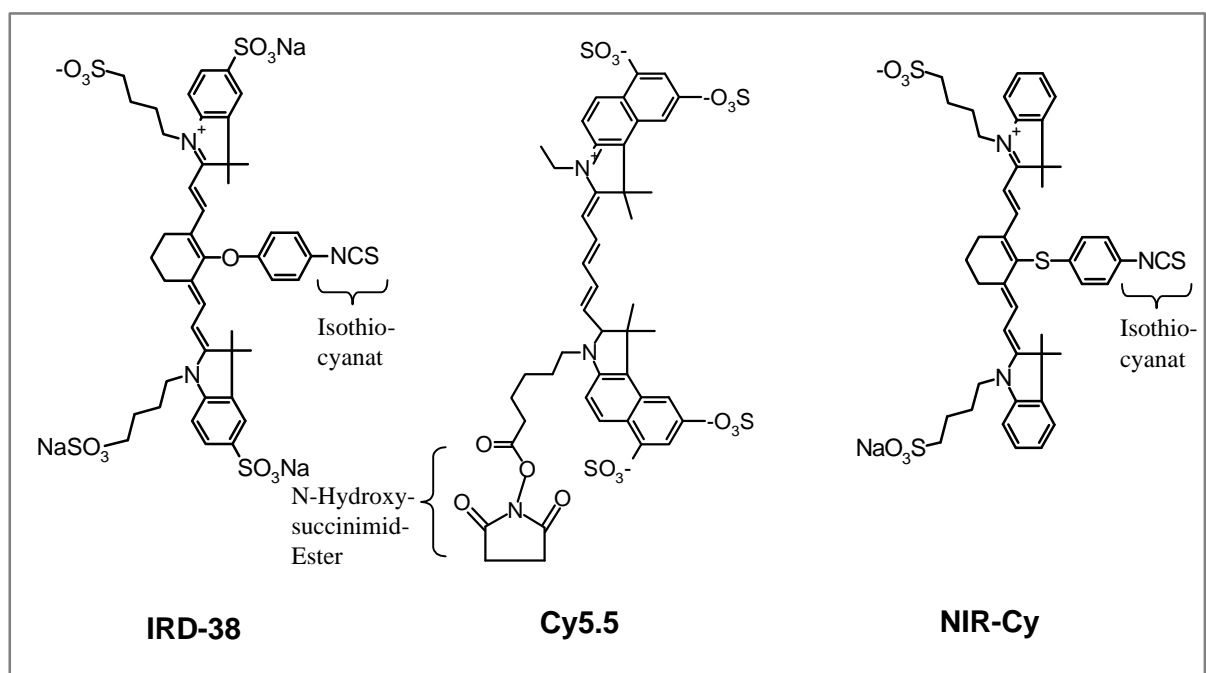
Neben dem Einsatz der Cyanine im Bereich der Photographie, der Farbstofflasertechnik oder als Datenträger optischer Speichersysteme werden diese Farbstoffe in der Medizin genutzt. Hier dienen sie an Proteine gekoppelt der Fluoreszenzdetektion körpereigener Strukturen, Energieübertragungsprozesse sind hier von geringer Bedeutung.

So können beispielsweise Zellbestandteile wie das Cytoskelett nach Bindung eines Cyaninfarbstoffs an spezifische Antikörper fluorimetrisch sichtbar gemacht werden (Southwick *et al.*, 1990). Auch oberflächennahe Tumore oder Metastasen können auf diese Weise identifiziert werden, vorausgesetzt, es existieren markierbare Antikörper gegen den zu detektierenden Karzinomtyp (Folli *et al.*, 1994). Gegenüber anderen Fluoreszenzfarbstoffen wie Fluorescein

sind die Cyaninfarbstoffe im Vorteil, da ihre maximale Excitation und Emission im NIR-Bereich liegt. Licht dieses Wellenlängenbereichs kann dickere Gewebeschichten passieren, Tumore sind auch unterhalb der Haut- oder gastrointestinalen Oberfläche detektierbar. Aber auch ohne eine Antikörperkopplung kommen die Cyaninfarbstoffe bei der Krebserkennung zum Einsatz. So werden sie als Kontrastmittel bei der Tumordetektion eingesetzt (Licha *et al.*, 2000). Man macht sich dabei einen veränderten Efflux des Farbstoffs aus tumorösem im Vergleich zum gesunden Gewebe zu Nutze. Neben dem diagnostischen Einsatz finden die Cyanine auch eine kurative Verwendung in der photodynamischen Therapie. Auf diesen Wirkungsbereich soll hier jedoch nicht näher eingegangen werden.

In dieser Arbeit wurde mit NIR-Cy, IRD38 und Cy5.5 gearbeitet (vgl. Kapitel 2.2).

Abb. 1.5: Strukturformeln der Cyaninfarbstoffe



Die strukturellen Darstellungen sind den Produktbeschreibungen der jeweiligen Farbstoffe entnommen. Hersteller und ausführliche Namensdeklaration sind in Kapitel 2.2 aufgelistet.

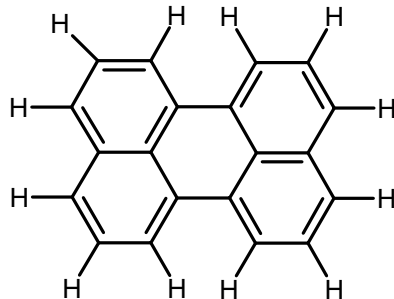
NIR-Cy und IRD38 wurden ursprünglich in der Arbeitsgruppe Streckowski (Georgia State University, Atlanta) entwickelt mit dem Ziel einer effizienten Proteinmarkierung im NIR-Bereich für den medizinisch/klinischen Einsatz (Lipowska *et al.*, 1993). Mittlerweile sind diese Farbstoffe auch kommerziell erhältlich (vgl. Kapitel 2.2).

Cy5.5 ist seit mehreren Jahren käuflich erwerbbar, die Herkunft seines Namens sowie die genaue Farbstoffbezeichnung findet sich bei Wolf (1998).

BTI

BTI ist ein Farbstoff der Rylene-Klasse. Prominenteste Vertreter dieser Klasse sind die Perylene. Ihre Grundstruktur wird in Abb. 1.6 dargestellt.

Abb. 1.6: Struktur des Perylen



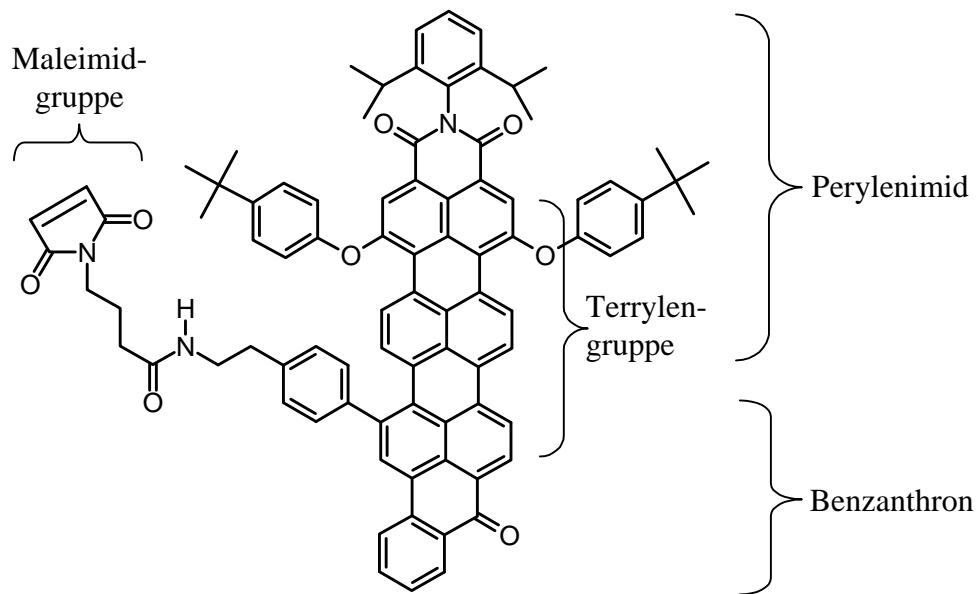
Perylenderivate werden industriell aufgrund ihrer chemischen, thermischen und photochemischen Stabilität besonders in der Farben- und Lackproduktion und zur Kolorierung von Kunststoffen eingesetzt (cf. Quante *et al.*, 1997). Darüber hinaus finden sie aber auch Verwendung in optischen Schaltungen, als Laserfarbstoffe (Sadrai *et al.*, 1992) und in der Photovoltaik. Hinweise auf die potentielle Nutzbarkeit in Solarzellen des Grätzeltyps (vgl. Kapitel 1.4.2) wurden von Ferrere *et al.* (1997) gefunden.

BTI ist ein Terrylderivat und wurde von Holtrup *et al.* (1997) entwickelt. Es stellt chemisch die Verknüpfung eines Perylenimids mit einem Benzanthron dar (vgl. Abb. 1.7). Ziel dieser Kombination zweier bekannter Fluoreszenzfarbstoffe war die Generierung eines neuen Typs von NIR-Fluoreszenzfarbstoffen unter Beibehaltung der hohen Quantenausbeute der Ausgangssubstanzen. Neben den oben schon vorgestellten Cyaninen waren zuvor nur Phthalocyanine, Xantheme und Oxazinfarbstoffe als Chromophore in diesem Wellenlängenbereich bekannt.

Das von Holtrup *et al.* (1997) generierte BTI wurde von A.Herrmann (MPI für Polymerforschung, Mainz) durch Einbau einer aromatischen Aminogruppe im Benzanthronteil modifiziert (in dieser Arbeit entspricht die Bezeichnung BTI immer diesem Farbstoffderivat).

Interessant für die Versuche dieser Arbeit wurde dieser Farbstoff durch eine Funktionalisierung mit einer Maleimidgruppe, was eine Kopplung an das Lhcb-1 ermöglichte (vgl. Kapitel 4.2.4.1).

Abb. 1.7: Struktur von Maleimido-BTI



Maleimido-BTI zeigte durch die Funktionalisierung keine Veränderung der physikalischen Eigenschaften. Typischen Charakteristika wie der Stokes-Shift von über 30 nm und eine hohe Photostabilität blieben erhalten.

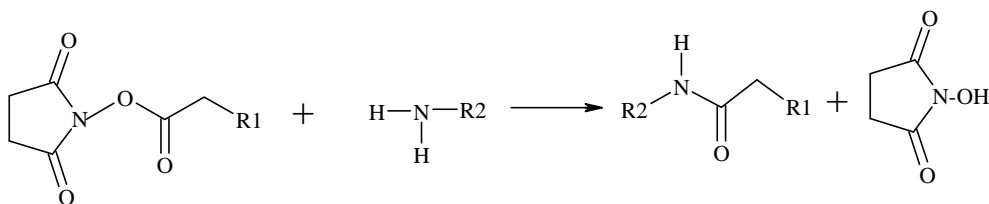
1.3.2 Farbstoffbindung an das Lhcb-1

Die Cyaninfarbstoffe und der BTI wurden über drei verschiedene funktionelle Gruppen an das Lhcb-1 gekoppelt.

1.) N-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester):

Cy5.5 trägt als funktionelle Gruppe einen NHS-Ester. Dieser kann mit deprotonierten primären Aminogruppen reagieren. Es erfolgt ein nucleophiler Angriff des N-Atoms einer Aminogruppe am C-Atom der NHS-Ester-Carbonylgruppe. NHS wird abgespalten, der übrige Farbstoff kovalent an die Aminogruppe gebunden.

Abb. 1.8: Reaktion einer Aminogruppe mit einem NHS-Ester

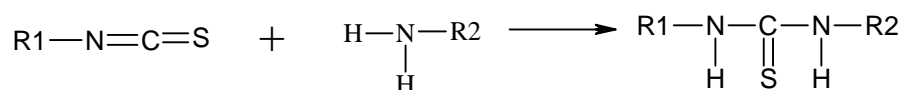


Soll, wie im Fall der Cy5.5-Kopplung an Lhcb-1, die Farbstoffbindung an einer spezifischen Stelle im Protein erfolgen, bietet sich eine Reaktion mit der N-terminalen Aminogruppe an. Diese Aminogruppe besitzt einen niedrigeren pK-Wert als die übrigen reaktionsfähigen Gruppen des Proteins aufgrund der Elektronegativität des benachbarten Sauerstoffs der Carbonylgruppe. Über mehrere Atome hinweg erfolgt ein Elektronensog auf das freie Elektronenpaar des terminalen Stickstoffatoms, eine Protonierung wird erschwert. Über die Einstellung eines pH-Werts im Bereich pH 7-8 kann daher eine Versuchsbedingung geschaffen werden, bei dem die Aminogruppe basischer Aminosäuren protoniert, die des N-terminus jedoch noch deprotoniert vorliegt.

2.) Isothiocyanat-Gruppe (NCS):

IRD38 und NIR-Cy tragen eine Isothiocyanatgruppe. Auch diese funktionelle Gruppe reagiert, ähnlich dem NHS-Ester, mit deprotonierten Aminogruppen. Es kommt zu einem nucleophilen Angriff des Aminogruppen-Stickstoffs am Kohlenstoff des NCS. Eine ortsspezifische Farbstoffmarkierung ist daher auch hier über die Wahl eines geeigneten pH-Werts am Protein-N-terminus möglich (vgl 1.).

Abb. 1.9: Reaktion einer Aminogruppe mit einer NCS-Gruppe

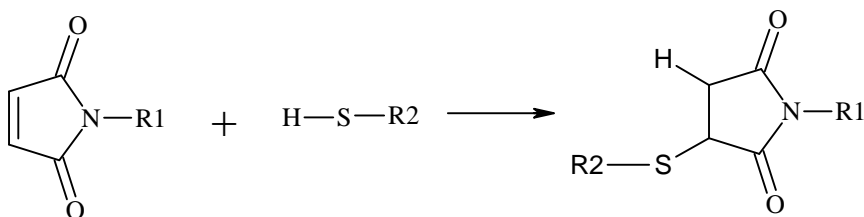


3.) Maleimidgruppe:

BTI wurde durch Einfügen einer Maleimidgruppe funktionalisiert (C.Kohl, MPI für Polymerforschung, Mainz). IRD38 und NIR-Cy wurden in einer zweistufigen Reaktion (vgl. Kapitel 3.1.2.2) mit dieser funktionellen Gruppe ausgestattet.

Maleimidgruppen sind SH-reaktiv, d.h. sie reagieren mit der Mercaptogruppe von Cysteinen in einer Michael-Addition. Es erfolgt ein nucleophiler Angriff des Schwefels auf die aktivierte Doppelbindung des Maleimids.

Abb. 1.10: Reaktion einer Mercaptogruppe mit einem Maleimid



Die meisten Proteine besitzen mehrere Cysteine, daher ist die genannte Farbstoffkopplung nicht zur selektiven, singulären Markierung des Polypeptids geeignet. Anders verhält es sich beim LHCII. Er besitzt ein einziges Cystein an der 79. Position.

Im rekombinanten Protein kann diese Aminosäure gegen Serin ausgetauscht und an anderen, markierungsrelevanten Stellen, wie dem N- oder C-terminus, wieder eingefügt werden (vgl. Kapitel 2.3). Ortsspezifische Farbstoffmarkierungen werden auf diese Weise möglich.

1.4 Verwendung der LHCII-Farbstoff-Konstrukte

Die potentielle Verwendung der biomimetischen Modelle wurde zum einen in der einzelmolekularen Charakterisierung des LHCII-internen Energietransfers und zum andern in der technischen Nutzbarmachung der Lichtsammeleffizienz des LHCII gesehen. Da in beiden Bereichen bislang mit dem Lichtsammlerkomplex nur wenig bzw. im Bereich der technischen Nutzung gar nicht gearbeitet worden war, bestand die Hauptaufgabe dieser Arbeit, die notwendigen Grundlagen für weitergehende Experimente zu schaffen. Es stand daher nicht der direkte Einsatz der LHCII-Farbstoff-Konstrukte im Vordergrund, weshalb die meisten Messungen mit dem LHCII ohne Energieakzeptor durchgeführt wurden.

1.4.1 Einzelmolekülspektroskopie zur Charakterisierung des LHCII-internen Energietransfers

Ein Ziel dieser Arbeit war die nähere Charakterisierung des LHCII-internen Energietransfers. Der komplexinterne Energieübergang wurde in den vergangenen Jahren sehr intensiv mittels zeitaufgelöster Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie erforscht. Nahezu alles, was bislang über die energetischen Vorgänge bekannt ist, entstammt dieser Meßtechnik mit all ihren Variationsmöglichkeiten in der Versuchskonzipierung (vgl. Kapitel 1.2).

Nachteil der bisherigen zeitaufgelösten Messungen ist eine versuchsbedingte statistische Mittelung aller Energietransferaten über die vermessene LHCII-Population. In keinem Versuch wurden Transferereignisse an singulären Komplexen quantifiziert. Man weiß bislang nichts darüber, ob der Energietransfer durch ein LHCII-Molekül in immer gleicher Weise, mit immer der selben Geschwindigkeit und der gleichen Effizienz abläuft. Existiert beispielsweise ein singuläres Chlorophyll mit dem energetisch niedrigsten Anregungszustand im Komplex, welches exklusiv die Energie an die minore Antenne abgibt, oder bestehen hier Variationsmöglichkeiten? Ist die Verweildauer der Anregungsenergie im Komplex immer gleich groß? Diese und viele weitere Fragen könnten nur durch die Untersuchung einzelner Komplexe näher beleuchtet werden.

Die Einzelmolekülspektroskopie ist jedoch eine sehr junge spektroskopische Methode und blickt erst auf ein ca. 10 jähriges Bestehen zurück. Energietransferstudien an Lichtsammlerkomplexen wurden bislang nur von wenigen Arbeitsgruppen durchgeführt und beschränkten sich in der Regel auf die Erforschung bakterieller Antennensysteme (s.u.). Wichtigstes Ziel diesbezüglicher Versuche dieser Arbeit war daher die Etablierung eines funktionierenden Meßsystems für den LHCII, bevor weitergehende Projekte mit den LHCII-Farbstoff-Konstrukten begonnen werden konnten (vgl. Kapitel 7.2.4).

Die Einzelmolekülspektroskopie verbindet die Vorteile zweier methodischer Vorgehen. Zum einen werden die zu untersuchenden Proben in einem konfokalen Mikroskop detektiert, was eine sehr hohe Auflösung des Meßobjekts erlaubt. Zum anderen kann aufgrund der hohen Fluoreszenzquantenausbeute der Lichtsammelpigmente eine Veränderung der Lichtqualität und -quantität einzelner Moleküle sichtbar gemacht werden. Eine Fluoreszenzspektroskopie an einzelnen LHCII-Komplexen ist möglich.

Um den potentiellen Erkenntnisgewinn für Energietransfer und Struktur des LHCII zu verdeutlichen, soll im folgenden der LH2 als Modell herangezogen werden. Er ist das bislang am stärksten auf einzelmolekularer Ebene untersuchte Lichtsammlerprotein und veranschaulicht die Möglichkeiten dieser neuen Technik.

Die Struktur des LH2 konnte durch Röntgenbeugungsexperimente (McDermott *et al.*, 1995) mit einer Auflösung von 2,5 Å bestimmt werden. Aufgrund dieser hohen Auflösung war auch eine Bestimmung der Lage der Chromophore und damit der Zuordnung ihrer Übergangsdipolmomente möglich. Der LH2 besteht aus zwei konzentrischen Proteinringen mit je 9 transmembranen Helices. Zwischen den beiden Ringen sind die Chromophore, Bakteriochlorophyll a (Bchl) und Carotinoide, in 2 Gruppen ebenfalls ringförmig orientiert. 9 Bchl liegen in der Membranebene und absorbieren bei 800 nm. Man spricht daher vom B800-Ring. 18 Bchl liegen senkrecht zur Membranebene, absorbieren bei 850 nm und bilden daher den B850-Ring.

Bis zur ersten einzelmolekularen Untersuchung des LH2 (Bopp *et al.*, 1997) herrschte Uneinigkeit über die Energietransferprozesse in diesem Lichtsammelkomplex (*cf.* Vulto *et al.*, 1999). Man wußte zwar von einem ultraschnellen Energieübergang von B800 nach B850, konnte diesen jedoch aufgrund der geringen spektralen Überlappung der Donorfluoreszenz und der Akzeptorabsorption nicht mit Hilfe der Förster-Gleichung zum RET erklären (Mukai *et al.*, 1999). Man diskutierte eine starke excitonische Kopplung der Chromophore im B850.

Van Oijen *et al.* (1999) zeigten dann in einzelmolekularen Untersuchungen die prinzipiellen Energietransfermechanismen im B800- und B850-Ring. Sie errechneten eine Energiedelokalisation im Ring 850, ermittelten für den Ring B800 jedoch eine Energielokalisation auf einzelnen Chromophoren. Gezeigt wurde dies in 1,2 K-Messungen durch die Aufnahme von Excitationsspektren, aus welchen die Verteilung der Übergangsenergien [δ] einzelner Pigmente ermittelt wurde. Dazu wurde die Excitationsbreite der Pigmente gemessen, welche sich durch den Variationsgrad der Proteinumgebung ergab. δ war für B800 und B850 je 125 cm^{-1} . δ wurde nachfolgend ins Verhältnis gesetzt mit I , das die Interaktionsstärke zweier benachbarter Bakteriochlorophylle angibt. Für B800 wurden Interaktionsstärken von nur 24 cm^{-1} aus dem zwischenmolekularen Abstand und der Dipolorientierung ermittelt. I/δ war daraus folgernd nur ca. 0,2 groß, was eine Lokalisation der Anregungsenergie auf ein singuläres Bchl bedeutete. Für B850 wurden dagegen I/δ -Quotienten deutlich größer 1 ermittelt.

Auch die Befunde von Bopp *et al.* (1997 und 1999) und Tietz *et al.* (1999 und 2000) deuteten in Richtung einer Energiedelokalisation im B850-Ring. So ermittelte Bopp *et al.* (1997) nach Anregung von B800 einen ultraschnellen Energietransfer auf B850 im Bereich von 650 fs. Im B850-Ring wurde nachfolgend das Auftreten von unpolarisierter Fluoreszenz detektiert, was auf eine Lichtemission verschiedener Bakteriochlorophylle schließen ließ. Die Fluoreszenzlebensdauer im LH2 wurde mit 1 ns beziffert, so daß in dieser Zeit die Anregungsenergie an jedes beliebige Bchl übertragen werden konnte.

Bei Temperaturen $<200\text{K}$ wurde dagegen das Auftreten von linear polarisiertem Fluoreszenzlicht im B850 detektiert (Tietz *et al.*, 1999). Ein lokales Energieminimum im B850 wurde hierfür verantwortlich gemacht, eine Abweichung von der zuvor angenommenen radialen Symmetrie im LH2 wurde gefordert (Bopp *et al.*, 1999; Tietz *et al.*, 1999). Tietz *et al.* (2000) stellten ein Modell des LH2 in Form eines elliptischen Rings vor. Es wurde eine Delokalisation der Anregungsenergie über fünf Chromophore postuliert. Da zwischen diesen Pigmenten eine starke excitonische Kopplung angenommen werden mußte, ergab sich die Notwendigkeit der Emission von linear polarisiertem Fluoreszenzlicht.

Damit konnten mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie nicht nur profunde Kenntnisse über den komplexinternen Energietransfer erhalten werden, auch strukturelle Informationen über die schon kristallographisch dargestellten hinaus wurden zugänglich.

Der LHCII höherer Pflanzen ist im Gegensatz zum LH2 deutlich weniger gut einzelmolekular untersucht. Erste Erkenntnisse zum Energietransfer singulärer Komplexe wurden von Tietz *et al.* (2001) dargelegt. So konnte in Raumtemperaturmessungen nach Anregung mit zirkular polarisiertem Licht eine Chlorophyllemission von linear polarisiertem Licht beim Monomer

($p = 1$) und gering polarisiertem Licht beim Trimer ($p = \sim 0,4$) gemessen werden, was auf eine unterschiedliche Anzahl von Emitttern in den Komplexen schließen ließ. Bei Monomeren und Trimeren traten zudem unterschiedliche Modi der Chlorophyllbleichung auf (eine Diskussion der Ergebnisse erfolgt vergleichend mit den Resultaten dieser Arbeit in Kapitel 7.2).

Orientierte Immobilisation des LHCII

Um ausgehend von diesen Ergebnissen tiefere Einblicke in die Energieübertragungswege des LHCII zu erhalten und die Komplexstruktur in den kristallographisch nicht aufgelösten Bereichen näher zu beleuchten, war es die Aufgabe dieser Arbeit, den Komplex zu immobilisieren. Bei der einzelmolekularen spektroskopischen Untersuchung von Chromophorensystemen ist es in vielen Fällen von Vorteil, mit Probenmaterial einer definierten Orientierung zu arbeiten. Eine unterschiedliche Polarisation des von den Pigmenten emittierten Lichts kann hier die räumliche Struktur der Probe näher beleuchten, Energietransferwege werden besser nachvollziehbar.

LH2 wurde dazu von Bopp *et al.* (1999), Tietz *et al.* (1999) und anderen Forschern auf Glimmer immobilisiert. Die Interaktion des Pigment-Protein-Komplexes mit der Oberfläche erfolgte dabei vermutlich über elektrostatische Interaktionen. So trägt die Glimmeroberfläche negative Ladungen, wogegen die C-terminale Proteinseite aufgrund der Anwesenheit von 18 Lysin positiv geladen ist. Eine Interaktion mit der N-terminalen Proteinseite ist unwahrscheinlich aufgrund der gehäuften negativen Ladung der dort lokalisierten 27 Glutamate.

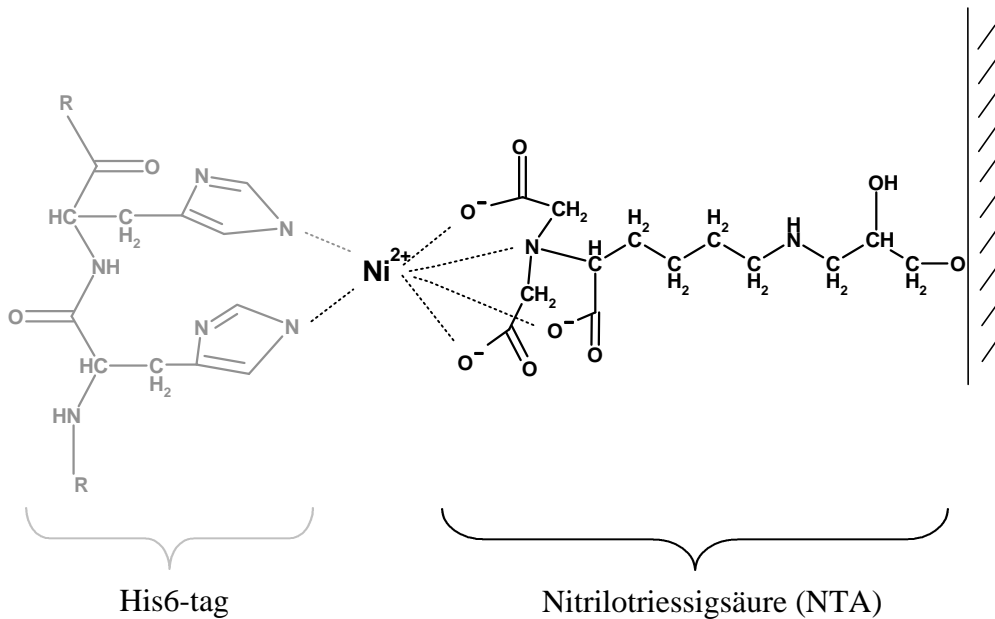
Als weiterer Lichtstammelkomplex wurde Allophycocyanin untersucht (vgl. Ying und Xie, 1998). Auch hier fand eine orientierte Immobilisation über elektrostatische Interaktionen statt. Ying und Xie (1998) arbeiteten mit dem Allophycocyanintrimer und erreichten auf einer geladenen Glasoberfläche eine definierte Bindung.

Bisherige Versuche am LHCII fanden bei einer zufälligen Komplexorientierung statt (Tietz *et al.*, 2001), da obige Immobilisierungsmethoden nicht erfolgreich verliefen (mündliche Mitteilung von C. Tietz). Um aber Energietransferprozesse und strukturelle Besonderheiten des LHCII zu beleuchten, ist eine definierte Orientierung notwendig. Gerade die Frage der Dipolorientierung der Chromophore im Protein ist zum Verständnis der energetischen Übergänge essentiell und kann nur an definiert immobilisierten Komplexen beantwortet werden (vgl. Kapitel 7.2).

In dieser Arbeit wurde daher ein neuer Immobilisierungsansatz verwendet. Es wurde eine LHCII-Oberflächenbindung ähnlich der einer ATPase in den Versuchen von Pänke *et al.* (2000) angestrebt.

Einzelmolekulare Untersuchungen an einer orientiert immobilisierten ATPase wurden erstmals von Noji *et al.* (1997) durchgeführt. Es wurde dazu das Apoprotein genetisch derart modifiziert, daß eine Abfolge von sechs Histidinen (His6-tag) auftrat. Histidin hat die Eigenschaft, über den Imidazolring mit Metallionen interagieren zu können. Besonders starke Wechselwirkungen werden mit Ni^{2+} -Chelaten beobachtet. Dabei wird das Nickelion von Nitrilotriessigsäure (NTA) vierfach koordinativ komplexiert. Es verbleiben zwei freie Koordinationsstellen, die jeweils mit dem freien Elektronenpaar des Stickstoffs im Imidazolring interagieren (vgl. Abb. 1.11). Damit sind eine Abfolge zweier Histidine zur Besetzung aller Koordinationsstellen notwendig. Die Wahrscheinlichkeit der Etablierung einer starken Protein-Ni-NTA-Bindung wächst mit zunehmender Länge der Histidinkette (Conti *et al.*, 2000). Eine Abfolge von sechs dieser Aminosäuren ist jedoch in den meisten Fällen ausreichend.

Abb. 1.11: Interaktion zweier Histidin-Imidazolringe mit Ni-NTA (nach Qiagen; 2000)

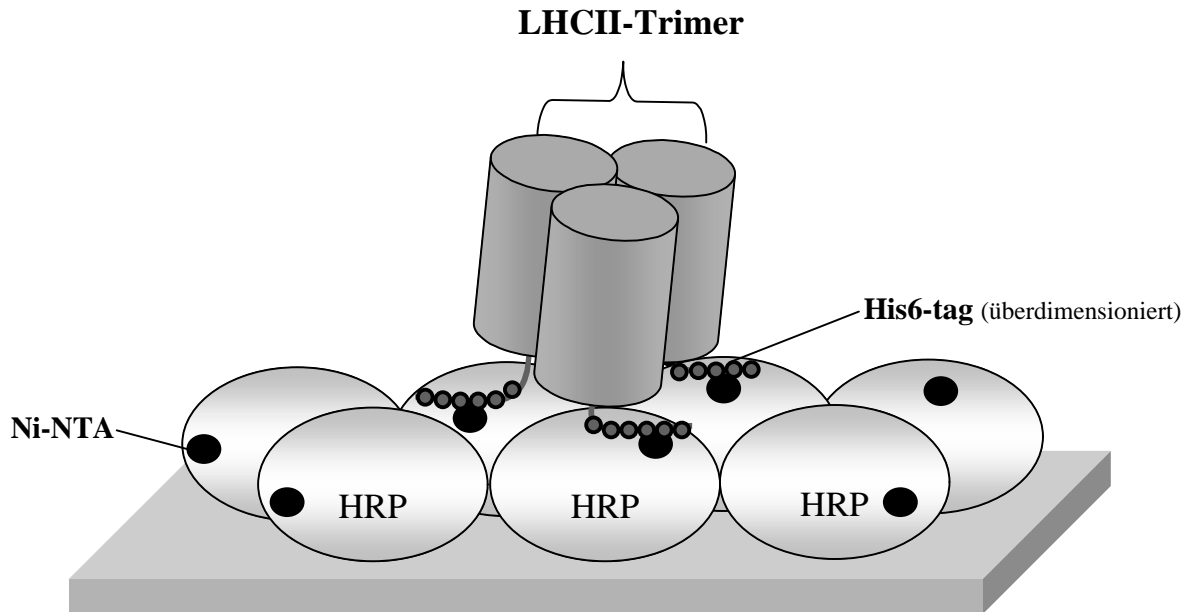


Zur Nutzung der Ni-NTA-Interaktion mit His6-tag-Proteinen im Bereich der Einzelmolekülspektroskopie ist eine Ni-NTA-Belegung ebener Oberflächen notwendig. Kommerziell erhältliche derivatisierte Oberflächen sind beispielsweise Ni-NTA beschichtete Polystyrolmikrotiterplatten, welche jedoch nicht den Erfordernissen einer ebenen Fläche genügen (Qiagen, Hilden). Weitere auf diese Weise modifizierte Oberflächen werden von BIACORE (Uppsala, Schweden) vertrieben.

Eine Möglichkeit, beliebige Glasoberflächen mit geringem Aufwand selbst zu funktionalisieren, bietet die Ni-NTA-Meerrettich-Peroxidase (Ni-NTA-HRP, Qiagen, Hilden). Dieses Protein immobilisiert spontan an Glasoberflächen. Nachteil der Methode ist, daß eine definierte Orientierung des His6-tag-Proteins nicht per se gewährleistet werden kann, da die Ni-NTA-Gruppe nicht notwendigerweise senkrecht zur Glasoberfläche ausgerichtet ist. Noji *et al.* (1997) konnten jedoch mit Hilfe dieser Immobilisierungsmethode die Funktionsweise der ATPase in aufrechtem Zustand untersuchen.

Für LHCII-Trimere wurde eine Orientierung ähnlich derer in der Thylakoidmembran aufgrund dreier His6-tags (jeweils einer pro monomerer Untereinheit) als wahrscheinlich erachtet. Abb. 1.12 verdeutlicht eine mögliche Orientierung des Komplexes auf einer Ni-NTA-HRP-beschichteten Glasoberfläche.

Abb. 1.12: LHCII-Trimer mit drei His6-tags immobilisiert an eine mit Ni-NTA-HRP beschichtete Glasoberfläche



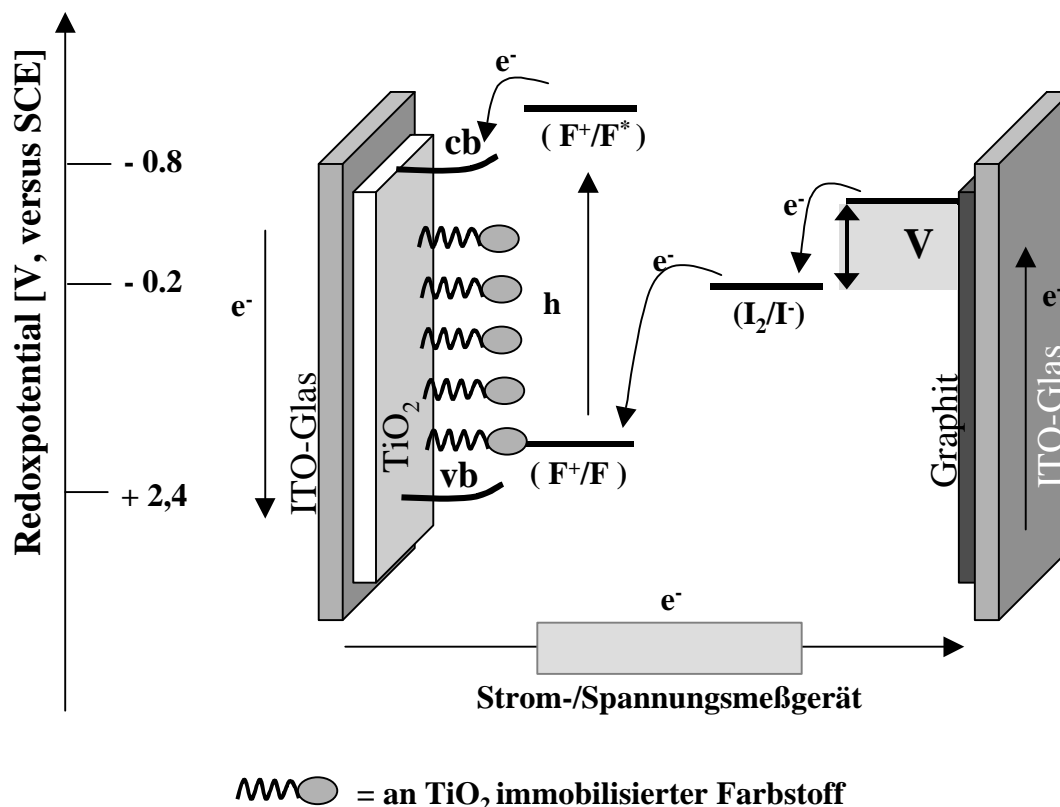
Ob die in Abb. 1.12 dargestellte LHCII-Orientierung der im Versuch realisierten Immobilisierung entspricht, wurde in einzelmolekularen Messungen überprüft. Wenn es gelänge, den LHCII in einer definierten Orientierung an die Ni-NTA-beschichtete Oberfläche zu binden, wäre eine solche Immobilisation auch für die generierten biomimetischen Modelle möglich. Energietransferprozesse innerhalb des LHCII und vom LHCII auf den Energieakzeptor wären damit näher charakterisierbar. Mittelfristig angestrebt wird mit Hilfe dieser Modelle eine Identifizierung der Chlorophyll-Dipolmomente im LHCII (vgl. Kapitel 7.2).

1.4.2 Technische Nutzbarkeit des Lichtsammelprinzips von LHCII

In einer zweiten Fragestellung wurde in dieser Arbeit an einer Möglichkeit der technischen Nutzung der Lichtsammelfunktion des LHCII gearbeitet. Von einer Reihe von Nutzungsmöglichkeiten (vgl. Kapitel 7.3) wurde die Verwendung der absorbierten Lichtenergie zur Stromgenerierung angestrebt. Als Grundprinzip wurde die von M.Grätzel und seinen Mitarbeitern entwickelte Solarzelle (O'Regan und Grätzel, 1991) verwendet.

Die sog. Grätzelzelle ist eine photovoltaische Zelle, in der die von einem Farbstoff aufgenommene Sonnenenergie zur Elektroneninjektion in das Leitungsband eines Halbleiters genutzt wird. Der Farbstoff wird dabei oxidiert und erhält nachfolgend von einer Graphitelektrode das fehlende Elektron zurück. Ein Stromfluß wird etabliert.

Abb. 1.13: Schema einer Solarzelle nach M.Grätzel
(modifiziert nach <http://dcwww.epfl.ch/lpi/solarcellE.html>)



Licht geeigneter Wellenlängen wird von einem an TiO_2 -immobilisierten Farbstoff (F) absorbiert und damit F in den angeregten Zustand F^* überführt. F^* hat ein Redoxpotential negativer als $-0,8$ V und kann daher Elektronen in das Leitungsband (cb) des Halbleiters injizieren. Zurück bleibt F^+ , welches vom Elektrolyten I_2/I^- reduziert wird. Der Elektrolyt wiederum erhält das fehlende Elektron von einer Graphitschicht, die die Gegenelektrode darstellt. Da TiO_2 und die Graphitschicht auf SnO_2 -beschichtetem und damit leitendem Glas (ITO-Glas) aufgebracht sind, kann ein Stromfluß gemessen bzw. eine Spannung abgegriffen werden. Die Photospannung stellt die Differenz des quasi-Fermi-Niveaus von TiO_2 bei Belichtung und des Redoxpotentials des Elektrolyten dar. [vb = Valenzband; SCE = Standardwasserstoffelektrode]

Wie aus Abb. 1.13 zu sehen, handelt es sich bei der Grätzelzelle um ein Sandwich-System, bestehend aus den beiden Elektrodenplatten und einem diese Elektroden verbindenden Elektrolyten (O'Regan und Grätzel, 1991).

Die Anode stellt eine mit dem Halbleiter TiO_2 -beschichtete Indium-Zinn-Oxid-Glasplatte (ITO-Glas) dar. Das Halbleitermaterial ist mit dem eigentlichen Sensitizer, einem im sichtbaren Bereich absorbierenden Farbstoff, beschichtet. Im angeregten Zustand besitzt dieser Farbstoff ein so stark negatives Redoxpotential, das er Elektronen in das Leitungsband des TiO_2 injizieren kann. Das verbleibende Farbstoffkation wird über die Graphitkathode (ebenfalls aufgebracht auf ITO-Glas) unter Vermittlung des Elektrolyten reduziert. Bedingt durch die Aufbringung beider Elektroden auf dem leitfähigen Glasmaterial, etabliert sich ein Stromfluß.

In dieser Arbeit wurde der Ersatz des Farbstoff-Sensitizers durch LHCII angestrebt. Ziel war es, den Lichtsammler auf TiO_2 so zu immobilisieren, daß nach Lichtabsorption eine Elektroneninjektion in das Leitungsband des Halbleiters erfolgt. Diese Elektroneninjektion könnte entweder direkt von einem komplexgebundenen Chla oder aber von einem an den LHCII gekoppelten Energieakzeptor aus erfolgen. Um sich diesem Ziel zu nähern, bestand zunächst die

Aufgabe darin, eine möglichst große Stoffmenge LHCII an die Halbleitermatrix zu koppeln, ohne daß eine Denaturierung der Komplexe auftritt.

TiO₂ kommt in der Natur in drei kristallinen Modifikationen als Rutil, Anatas und Brookit vor. Allen Formen gemein ist ein oktaedrischer Metalloxidaufbau mit Titan in einer sechsfachen Koordination mit Sauerstoff.

Thermodynamisch ist die Rutil-Struktur am stabilsten. Es geht aus den anderen beiden Modifikation durch Erhitzen hervor. Bei der Rutil-Struktur handelt es sich um ein verzerrt hexagonal dichtest gepacktes Sauerstoff-Anionengitter, in dem die Titan-Kationen nur die Hälfte der Oktaederlücken besetzen. Das Resultat ist eine dreidimensionale Struktur mit der Koordinationszahl 6 für Ti⁴⁺ und 3 für O²⁻ (nach Janiak *et al.*, 1999). Die Anatas- und Brookitstruktur ähnelt der des Rutils, jedoch handelt es sich hier um eine kubisch dichteste Kugelpackung der Sauerstoffatome.

Der Hauptverwendungszweck von TiO₂ liegt in der Farbenherstellung. Hier wird es als Pigment aufgrund seines hohen Brechungsindex (über 2,5 und damit größer als der des Diamants) eingesetzt. Aber auch als Füllstoff für Gummi und Kunststoffe oder bei der Oberflächenvergütung von Papier wird es verwendet (Greenwood und Earnshaw, 1990).

Für die Versuche dieser Arbeit wurde eine weitere Eigenschaft des TiO₂ genutzt. So gehört dieses Metalloxid zur Gruppe der Halbleiter des n-Typs. Die Rutilform hat eine Bandlücke von ca. 3,0 eV, die Anatasform eine von ungefähr 3,2 eV. Für beide Formen besteht aufgrund der großen Bandlücke nur für energiereiches ultraviolettes Licht die Möglichkeit, Elektronen ins Leitungsband des TiO₂ zu injizieren. Das Halbleitermaterial erscheint daher weiß. Bandlücken anderer Halbleiter sind deutlich kleiner. So beträgt sie für Silizium nur 1,1 eV. Solarzellen aus Silizium sind daher in der Lage, Licht sichtbarer Wellenlängen zur Elektroneninjektion in das Leitungsband zu nutzen.

TiO₂ ist aufgrund der großen energetischen Lücke zwischen Valenz- und Leitungsband kein idealer Halbleiter im Sinne der Photovoltaik. Große Teile des sichtbaren Lichts können nicht zur Stromgewinnung genutzt werden. Dieser vordergründige Mangel kann durch Beschichtung des Halbleiters mit einem im sichtbaren Bereich absorbierenden Farbstoff behoben werden, sofern dieser im angeregten Zustand Elektronen in das Leitungsband injiziert. Eine Solarzelle nach dem Prinzip der Grätzelzelle entsteht. Der Vorteil einer solchen Zelle gegenüber den traditionellen Siliziumzellen liegt in der räumlichen Trennung von angeregtem Elektron und verbleibendem Loch. Elektronen-Loch-Rekombinationen sind deutlich erschwert im Vergleich zur Siliziumzelle. Die für die letzteren geforderte hohe Materialreinheit zur Vermeidung dieser Rekombinationsprozesse ist daher hier entbehrlich (Homepage M.Grätzel: <http://dcwww.epfl.ch/lpi/solarcellE.html>).

Die Geschwindigkeit der Elektroneninjektion in TiO₂ wurde an vielen Farbstoff-Halbleitermodellen gemessen. Es wurden Übergangszahlen vom Femtosekunden- bis zum Picosekundenbereich bestimmt. Zudem wurden teilweise monoexponentielle und teilweise multiexponentielle Übergangsraten gemessen, so daß keine einheitlichen Aussagen über das Prinzip der Elektroneninjektion gemacht werden können (Tachibana *et al.*, 2000). So wiesen Rehm *et al.* (1996) einen biexponentiellen Übergang der Größenordnung von 200 fs (Anteil von 95%) und >10 ps (5%) für die Elektroneninjektion eines Coumarinfarbstoffs in TiO₂ nach. Sie ordneten dabei jedoch nur die schnelle Komponente der eigentlichen Elektroneninjektion zu. Burfeind *et al.* (1996) fanden eine ähnliche Transferzeit von 190 fs für den Elektronenübergang von Perylen zu TiO₂. Kay *et al.* (1994) ermittelten abweichend davon eine Transferzeit von 450 ps für den Übergang von einem Chlorin in den Halbleiter. Ashbury *et al.* (1999) wiederum sprachen von einem biexponentiellen Übergang von 50 fs (zu über 84%) und 1,7 ps.

Trotz dieser recht erheblichen Abweichungen in der Elektroneninjektion wurden in allen Fällen Rekombinationsgeschwindigkeiten des oxidierten Farbstoffs mit Elektronen des TiO_2 -Leitungsbandes in der Größenordnung von Mikro- bis Millisekunden genannt. Eine Beeinträchtigung der Effizienz der Solarzellen durch Rekombinationsprozesse obiger Art wird daher aufgrund deren Langsamkeit ausgeschlossen.

An die Sensitizer werden in der Grätzelzelle einige Bedingungen gestellt. Sie müssen im angeregten Zustand ein negatives Redoxpotential von mindestens $-0,6\text{ V}$ besitzen, um in die Rutilform des TiO_2 seine Elektronen abgeben zu können und eines von mindestens $-0,8\text{ V}$, um in die Anatasform injizieren zu können (O'Regan, 1998).

Daneben sollte das Redoxpotential im nicht angeregten Zustand sehr positiv sein, um Farbstoffkationen durch einen Elektrolyten mit einem möglichst stark positiven Redoxpotential reduzieren zu können. Besitzt der Farbstoff nur ein gering positives oder gar negatives Redoxpotential, muß der Elektrolyt ein noch geringer positives bzw. stärker negatives besitzen. Die Folge ist eine Reduktion der abgreifbaren Photospannung, also der Differenz des Halbleiter-quasi-Fermi-Niveaus unter Belichtung (Energieniveau des höchsten besetzten Orbitals) und dem Redoxpotential des Elektrolyten (Abb. 1.13).

Entwicklung der Grätzelzelle

Erste Versuche mit den farbstoffbeschichteten Solarzellen zeigten eine enttäuschende Konversionsrate des Lichts in elektrische Energie. Nur 1% des einfallenden Lichtes einer Wellenlänge konnte elektrisch genutzt werden (O'Regan und Grätzel, 1991). Ein Aufbringen von Farbstoffmultilayern führte zu keiner Verbesserung.

Den Durchbruch stellte der Auftrag des kristallinen TiO_2 in Form einer kolloidalen Lösung dar. Es gelang die Herstellung einer porösen Oberfläche, die pro Flächeneinheit eine größere Farbstoffmenge als das Monolayer binden konnte. Ein 30 minütiges Sintern des Halbleitermaterials bewirkte die Etablierung des elektrischen Kontakts zwischen den kristallinen Partikeln und ermöglichte nachfolgend die effizientere Nutzung des Sonnenlichtes durch eine größere Lichtabsorption pro Flächeneinheit. Energiekonversionen von deutlich $> 1\%$ traten auf (vgl. Tabelle 1).

Die Energiekonversion stellt die elektrische Leistung der Solarzelle in $[\text{mW}/\text{cm}^2]$ als prozentualen Anteil der Leistung des eingestrahlt Lichts in $[\text{mW}/\text{cm}^2]$ dar.

Bestimmt wird diese Energiekonversion im Versuch in 2 Schritten. Zunächst wird der Füllfaktor ermittelt:

$$\text{Füllfaktor} = \frac{\text{elektrische Leistung } [\text{mW}/\text{cm}^2]}{\text{abgreifbare Spannung } [\text{V}] \times \text{Kurzschlußstrom } [\text{mA}/\text{cm}^2]}$$

Danach wird die eigentliche Energiekonversion bestimmt.

$$\text{Energiekonversion} [\%] = \frac{\text{abgreifbare Spannung } [\text{V}] \times \text{Kurzschlußstrom } [\text{mA}/\text{cm}^2] \times \text{Füllfaktor}}{\text{Leistung des eingestrahlt Lichts } [\text{mW}/\text{cm}^2]} \times 100$$

Tabelle 1 zeigt die Zusammenstellung einiger bislang gemessener Energiekonversionsraten unter Verwendung unterschiedlicher Farbstoffgruppen als Elektroneninjektor.

Tabelle 1.1: Energiekonversionsraten verschiedener Modelle der Grätzelzelle

Farbstoff	Energiekonversion [%]	Versuchsbedingungen
trimerer Ruthenium-Bipyridin-Komplex ¹	7,1 - 7,9 12	Simulation von Sonnenlicht (AM 1.5 ²) einer Leistung von 8,3 - 75 mW/cm ² in diffusem Sonnenlicht gemessen
Ruthenium-Bipyridin-Komplex ³ = N3 mit 2 Thiocyanatgruppen	10,4 nahe 10	Simulation von Sonnenlicht (AM 1.5 ²) einer Leistung von 38,2 mW/cm ² Simulation von Sonnenlicht (AM 1.5 ²) einer Leistung von 24,1 – 96 mW/cm ²
Kupfer-Mesoporphyrin ⁴	3,1 2,6	Simulation von Sonnenlicht (AM 1.5 ²) einer Leistung von 10 mW/cm ² Simulation von Sonnenlicht (AM 1.5 ²) einer Leistung von 100 mW/cm ²
Zn-tetrasulfonyl-Phthalocyanin-Dimere ⁵	1,7	Simulation von Sonnenlicht (AM 1.5 ²) einer Leistung von 35 mW/cm ²
Anthocyanin, isoliert aus Brombeeren ⁶	0,56	Simulation von Sonnenlicht (AM 1.5 ²) einer Leistung von 100 mW/cm ²
Ruthenium-Phtalocyanin ⁷ zur NIR-Anregung	nicht beziffert; Photostrom von fast 10 mA/cm ² (in ¹ >12 mA/cm ²)	Simulation von Sonnenlicht (AM 1.5 ²) ohne Angabe einer Leistung
Hemicyaninderivat ⁸	1,93 2,6	Simulation von Sonnenlicht (AM 1.5 ²) einer Leistung von 94,6 mW/cm ² Simulation von Sonnenlicht (AM 1.5 ²) einer Leistung von 34,3 mW/cm ²
Coumarin-Derivat ⁹	5,6	Simulation von Sonnenlicht (AM 1.5 ²) einer Leistung von 100 mW/cm ²
“Black dye” ¹⁰ , ein pan-chromatischer Sensitizer aus der Gruppe der Terpyridyl-tris-Thiocyanato-Ruthenium-Komplexe	10,4	Simulation von Sonnenlicht (AM 1.5 ²) einer Leistung von 100 mW/cm ²

¹O'Regan und Grätzel, 1991

²AM1.5 = “Air mass 1.5”, es ist die von der “American Society for Testing and Materials (ASTM)” definierte Standard-Spektralverteilung des Sonnenlichtes auf der Erde <http://rredc.nrel.gov/solar/standards/am1.5/#about>

³Nazeeruddin *et al.*; 1993

⁴Kay und Grätzel, 1993

⁵Deng *et al.*, 1997

⁶Cherepy *et al.*, 1997

⁷Nazeeruddin *et al.*, 1998

⁸Wang *et al.*, 2000

⁹Hara *et al.*, 2001

¹⁰Nazeeruddin *et al.*; 2001

Es wurden einige Energiekonversionsraten zusammengestellt, die mit den genannten Farbstoffen in Solarzellen des “Grätzel-Typs” gemessen wurden. Das verwendete Halbleitermaterial lag dabei immer in der Anatas-Struktur vor.

Es konnten bislang maximale Energiekonversionen von 10,4% erreicht werden (vgl. Tabelle 1.1). Angestrebt werden mittelfristig 15%, welche nach Nazeeruddin *et al.* (2001) mit Hilfe des sog. “black dyes” in greifbare Nähe rücken. “Black dye” zeigt schon heute bei stärkerer Lichteinstrahlung (100 mW/cm²) die höchste Konversionsrate.

Solarzellen des kristallinen Silicium-Typs besitzen dagegen im industriellen Größenmaßstab (10×10 cm) bereits Energiekonversionsraten von 20% (Metz und Hezel, 2001) bei einer Lichteinstrahlung von 100 mW/cm² (AM1.5 Spektrum). Damit liegt die energetische Nutzung des Sonnenlichts schon sehr nahe am theoretisch maximal möglichen Konversionswert von 28% für dieses photovoltaische Prinzip (Informationszusammenstellung unter <http://www.shell.com/de-de/content/0,4645,27243-54536,00.html>).

Zur längerfristigen Kompetition der Grätzelzelle mit photovoltaischen Zellen des Siliciumtyps wird es daher entweder nötig sein, die Energiekonversionsrate deutlich zu erhöhen oder aber kostengünstiger zu produzieren.

Mit der Wahl des LHCII als Absorbanz und möglicherweise auch Sensitizer wären Fortschritte auf beiden Kompetitionsgebieten möglich. Das Protein kann in beliebigen Mengen günstig produziert und in vitro gefaltet werden, seine Aufbringung auf TiO₂ ist sehr kostengünstig. Darüber hinaus kann LHCII ca. 38% des Lichts im sichtbaren Bereich zur Ladungstrennung nutzen, was zu einer erhöhten Energiekonversionsrate als mit den künstlichen Farbstoffen führen könnte (vgl. Kapitel 9.2). Zwar ist „black dye“ schon heute in der Lage, nahezu das gesamte Licht des sichtbaren Bereichs zu absorbieren, doch ist bislang nichts darüber bekannt, wann sich eine solch hohe Absorption auch in eine effiziente Energiekonversion niederschlägt (vgl. dazu Kapitel 7.3.4). Es ist daher möglich, daß LHCII oder ein LHCII-Farbstoff-Konstrukt die absorbierte Lichtenergie effizienter zu einer Elektroneninjektion in das Leitungsband von TiO₂ nutzen kann und nachfolgend eine höhere Energiekonversion aufgrund einer geringeren Dunkelstromrate (vgl. Kapitel 7.3.5) zeigt.

In der Pflanze liegt die Energiekonversionsrate bei ca. 21%, wenn man den Anteil des im sichtbaren Bereich auftreffenden Lichts ins Verhältnis setzt mit dem Energiegehalt des ersten stabilen Produkts der Ladungstrennung, Plastochinon B (vgl. Kapitel 9.2).

1.5 Ziele dieser Arbeit

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand in der Erstellung eines biomimetischen Modells aus LHCII und angekoppeltem Farbstoff. Nach Lichtanregung der komplexgebundenen Chlorophylle sollte ein gerichteter Energietransfer auf den Farbstoff erfolgen. Die eingestrahlte Lichtenergie sollte im Anschluß an den Energietransfer wieder verfügbar sein.

Erstes angestrebtes Ziel war eine Verfügbarkeit in Form von Farbstofffluoreszenz. Diese Farbstofffluoreszenz sollte von der Chlorophyllfluoreszenz deutlich unterscheidbar sein, um zum einen den Energietransfer leichter quantifizierbar zu machen und um zum anderen das LHCII-Farbstoff-Konstrukt für spektroskopische Untersuchungen einsetzen zu können.

Angestrebt wurde eine Nutzung der biomimetischen Modelle bezüglich dreier Fragestellungen.

1.) Welche strukturellen Eigenschaften besitzt der N-terminus des LHCII?

Angestrebt wurde hierzu die N-terminale Kopplung eines Energieakzeptors an verschiedene Mutanten des LHCII. Diese Mutanten sollten sich nur in der Länge des N-terminalen Proteinbereichs unterscheiden, so daß, je nach Faltung dieses Proteinbereichs, Farbstoff und nächstgelegenes Chlorophyll des Lichtsammelkomplexes in variierendem Abstand zueinander vorliegen. Aus den gemessenen Energietransfereffizienzen und den errechneten Werten zum försterkritischen Abstand R_0 sollte der molekulare Abstand von Donor und Akzeptor ausgerechnet und damit die relative Lage der N-terminalen Aminogruppe zum nächstgelegenen Chlorophyll ermittelbar werden.

2.) Wie erfolgt der Energietransfer im einzelnen LHCII-Molekül?

Es wurde eine orientierte Immobilisierung des LHCII auf Glasoberflächen angestrebt, um in einzelmolekularen spektroskopischen Messungen nachfolgend mehr über den komplex-internen Energietransfer in Erfahrung zu bringen. Nach der Etablierung eines funktionierenden Meßsystems für den LHCII sollte eine spektroskopische Analyse der biomimetischen Modelle erfolgen.

3.) Kann die vom LHCII absorbierte Lichtenergie technisch nutzbar gemacht werden?

Es sollten die Grundlagen zur Nutzung des LHCII in photovoltaischen Anlagen gelegt werden. Beabsichtigt wurde die Verwendung der absorbierten Lichtenergie in Solarzellen nach dem Prinzip der „Grätzelzelle“. Dazu sollte der LHCII zunächst auf den Halbleiter TiO_2 immobilisiert werden, um anschließend erste Versuche zur möglichen Energiekonversion durchzuführen. Es sollte entweder zu einer direkten Elektronenabgabe eines angeregten Chlorophylls in das Leitungsband von TiO_2 kommen oder aber zu einer Elektroneninjektion ausgehend vom Farbstoff eines LHCII-Energieakzeptor-Konstrukts.

2. verwendete Geräte, Chemikalien und Organismen

2.1 Geräte

Präparative Gelelektrophorese + Zubehör

- Mini Prep Cell, Gelsäule: 13 cm Länge, 7 mm Innendurchmesser
- Econo Pump, Model EP-1
- Fraction collector, Modell 2128
- Stromquelle: Power PAC 3000

Alle Geräte von der Firma Bio-Rad, Hercules, USA

Analytische Gelelektrophorese

- Midget-System, Firma Pharmacia LKB, Schweden

Speed-Vac

- Slab Gel Dryer, Firma LKB, Bromma, Schweden
- Vakuum Concentrator, Firma Bachhofer, Reutlingen

Fluorimeter

- Fluoromax-2, Firma Jobin Yvon, Grasbrunn, Germany mit Photomultiplier R928 (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee), Software: Datamx Software Version 2.24/Grams 32
Digital Thermostat Ministat Compatible Control, Firma Huber, Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg-Elgersweiler

Photometer

- MPS 2000 der Firma Shimadzu, Kyoto, Japan
- UV-2101PC, UV-Vis scanning spectrophotometer, Firma Shimadzu, Kyoto, Japan
- Mikrotiterplatten-Absorptionsmeßgerät: SPECTRAMaxPLUS, Firma Molecular Devices, Sunnyvale, California, Software: SOFTmax®PRO

Digitalisierungssysteme für Gele

- ScanJet 4c, Firma Hewlett Packard Instruments, Oregon, USA,
- Gel doc 1000, Firma Bio-Rad, Hercules, USA, UV-Lampe: 300 nm

Zentrifugen

- Ultrazentrifuge: Optima™XL-100K, Firma Beckmann Instruments
Rotor: SW60TI
- Kühlzentrifuge: Universal 30RF, Firma Hettich, Tuttlingen,
max. Umdrehungen: 15.000 rpm = 23.142×g
- Tischzentrifuge: EBA 12, Firma Hettich, Tuttlingen,
max. Umdrehungen: 14.000 rpm = 21.910×g

sonstige Geräte

- Weißlichtlampe KL1500 electronic, Firma Bachofer, Reutlingen
- Ultraschallbad: SONOREX super RK102H, Bandelin, Berlin
- Thermocycler: Genius, Firma Techne, Cambridge, UK

2.2 Chemikalien

Sparmix

4% SDS

1,4 M β -Mercaptoethanol

24% Glycerin

100 mM Tris-HCl pH 6,8

0,4 mM Bromphenolblau

(Bei Zusatz zu farbstoffmarkierten Proben ohne Bromphenolblau)

Farbstoffe

- Di-(2,4-Sulfonyl-benzo)-N-ethyl-tetramethylindodicarbocyanin-N'-pentanoyl-N-Hydroxysuccinimidylester (**Cy5.5**), Firma Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
- 1,1'-Bis(4-sulfobutyl)-11-(4-isothiocyanatophenylthio)-3,3,3',3'-tetramethyl-10,12-trimethylene-indotricarbocyanine Monosodium salt (**NIR-Cy**), Firma Fluka Chemie AG, Buchs/Schweiz
- **IRD38**, Firma LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA
- N-(2,6-Diisopropylphenyl)-14-[1-phenethyl-4-(maleimido)butanamid]-1,6-di(4-tert-butylphenoxy)-11(CO),12-benzoylterrylen-3,4-dicarboximid (**Maleimido-BTI**), hergestellt von C.Kohl, MPI für Polymerchemie, Mainz

Detergentien

- n-Octyl- β -D-glucosid (OG), Firma Bachem, Bubendorf
- n-Dodecyl- β -D-maltosid (LM), Firma Calbiochem, Frankfurt
- Natriumdodecylsulfat (SDS), Firma Boehringer Mannheim
- n-Nonyl- β -D-Glucoside (NG), Firma Bachem, Bubendorf

Enzyme

- Trypsin, Firma Boehringer Mannheim
- Thermolysin, Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Pronase E, Firma Merck eurolab, Frankfurt
- Proteinase K, Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Crosslinker

- 1,6-Diaminohexan (HDA), Firma Merck eurolab, Frankfurt
- m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester (MBS), Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Succinimidyl 4-(p-Maleimidophenyl) butyrat (SMBP), Firma Pierce, Rockford, USA

Reduktionsmittel

- Na-Dithionit, Firma Serva, Heidelberg
- Tris-(-2-cyanoethyl)-phosphin (TCEP), Firma MoBiTec, Göttingen

2.3 verwendete Lhcb-1-Mutanten

- D7f.3 (Wildtyp) Expressionsklon mit maturem *lhcb-1* (Wirtsstamm JM101)
Länge des überexprimierten Proteins 25,5 kDa = 232 AS
- 1h.19 (N-11) N-terminale Deletionsmutante (Wirtsstamm JM101)
Länge des überexprimierten Proteins 24,3 kDa = 221 AS
- Sca (N-21) N-terminale Deletionsmutante (Wirtsstamm JM101)
Länge des überexprimierten Proteins 23,1 kDa = 210 AS
- 26l.9 (N-58) N-terminale Deletionsmutante (Wirtsstamm JM101)
Länge des überexprimierten Proteins 19,1 kDa = 174 AS
- 26g.11 (N-61) N-terminale Deletionsmutante (Wirtsstamm JM101)
Länge des überexprimierten Proteins 18,8 kDa = 171 AS
- Lys6 C79S-Derivat mit N-proximaler Abfolge von 6 Lysinen
(Wirtsstamm JM101)
Länge des überexprimierten Proteins 26,0 kDa = 237 AS
- Glu6 C79S-Derivat mit N-proximaler Abfolge von 6 Glutamaten
(Wirtsstamm JM101)
Länge des überexprimierten Proteins 26,2 kDa = 238AS
- C79S (Hu1) D7f.3-Derivat mit einem AS-Austausch: Cys79 → Ser79
(Wirtsstamm JM101)
Länge des überexprimierten Proteins 25,5 kDa = 232 AS
- S3C (Hu2) D7f.3-Derivat mit zwei AS-Austauschen: Cys79 → Ser 79 und Ser3 → Cys3
(Wirtsstamm JM101)
Länge des überexprimierten Proteins 25,5 kDa = 232 AS
- S3Ch (Hu4) D7f.3-Derivat mit zwei AS-Austauschen: Cys79 → Ser 79 und Ser3 → Cys3
und einem C-proximalem „His6-tag“ (Wirtsstamm JM101)
Länge des überexprimierten Proteins 26,2 kDa = 238 AS

Tabelle 2.1: Sequenzvergleich von Wildtypprotein und den zwei neuen Klonen

Amino- säuren (*)	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.ff
D7f.3	Arg CGT	Lys AAA	Ser TCT	Ala GCT	Thr ACC	Thr ACC	Lys AAG	Lys AAA	Val GTA	Ala GCG	Ser	—————						
Glu 6	Arg CGT	Glu GAG	Glu GAA	Glu GAG	Glu GAA	Glu GAG	Glu GAA	Ser AGC	Ser TCT	Ala GCT	Thr ACC	Thr ACC	Ala GCC	Gly GGC	Cys TGC	Ala GCG	Ser	—————
Lys 6	Arg CGT	Lys AAG	Lys AAA	Lys AAG	Lys AAA	Lys AAG	Lys AAA	Ser TCT	Ala GCT	Thr ACC	Thr ACC	Ala GCC	Gly GGC	Cys TGC	Ala GCG	Ser	—————	

(*) Nomenklatur nach Kühlbrandt, Wang und Fujiyoshi, 1994

————— = Sequenz der drei Mutanten gleich mit Ausnahme eines AS-Austauschs in Position 85 (Glu6) bzw. 84 (Lys6), hier wurde jeweils Cystein gegen Serin ausgetauscht (Basensequenz entspricht der des C79S in diesem Bereich).

3. Methoden

3.1 Markierung des Lhcb-1 mit Fluoreszenzfarbstoffen sowie Aufreinigung der Lhcb-1-Farbstoff-Konstrukte

3.1.1 Aliquotierung der Farbstoffe

Zur Markierung von Lhcb-1 waren Farbstoffmengen von 10-100 nmol notwendig. Um solche geringe Stoffmengen bereitstellen zu können, wurden je 1 mg Cy5.5, NIR-Cy und IRD38 (pulverförmig) in 500 µl trockenem Methanol, BTI in trockenem Tetrahydrofuran (THF), aufgenommen und die Farbstoffkonzentration photometrisch ermittelt. Geeignete Stoffmengen wurden aliquotiert und unter Stickstoffzufuhr getrocknet. Die Aliquots wurden mit Parafilm abgedichtet und in einem mit Stickstoff gefüllten Schraubdeckelgefäß bei -20°C gelagert. Es wurde während des ganzen Vorgangs darauf geachtet, den Farbstoff frei von Wasser und dunkel zu lagern.

3.1.2 Farbstoffmarkierung des Lhcb-1

Die Farbstoffmarkierung des Lichtsammelproteins fand immer am Apoprotein Lhcb-1 statt, welches im Anschluß an die Kopplungsreaktion zum intakten LHCII rückgefaltet wurde.

3.1.2.1 Cy5.5-Markierungsansatz

Prinzip

Cy5.5 besitzt ein N-Hydroxysuccinimid als reaktive Gruppe. Diese ist aminofunktional, so daß bei Wahl eines geeigneten pH-Wertes eine selektive N-terminale Markierung erreicht werden kann (vgl. Kapitel 1.3). Im Versuch lag Lhcb-1 zu Beginn der Reaktion in reinen SDS-Mizellen vor. Durch Zugabe des nicht-ionischen Detergens n-octyl- β -D-glucopyranosid (OG) entstanden Mischmizellen geringerer negativer Ladungsdichte. Dies begünstigte die Markierung. Abstoßungsreaktionen zwischen dem Detergens umhüllten Protein und dem negativ geladenem Farbstoff wurden vermindert.

Methode

- 1 Volumenteil Lhcb-1 in 1% SDS
- + 1 Volumenteil 100 mM Natriumphosphat-Puffer (NaP), pH 7,35 (pH 7,2 bei plhcb-1)
- + 1 Volumenteil 10% OG
- + 7 Volumentile H₂O

wurden gemischt, auf ein Aliquot des Farbstoffes Cy5.5 pipettiert und mindestens 4 h dunkel bei Raumtemperatur inkubiert. Der Cy5.5-Überschuß war 6-fach molar. Lhcb-1 einer Konzentration von ca. 10 µg/µl wurde verwendet. Konzentrationen deutlich kleiner als 5 µg/µl waren zu gering für eine effektive Markierung. Die Reaktion wurde nach Ablauf der Zeit mittels eines 40-fach molaren Aminoethanolüberschusses abgestoppt.

3.1.2.2 NIR-Cy-Markierungsansatz

Prinzip

NIR-Cy besitzt eine aminofunktionelle Isothiocyanatgruppe. Da es in vielen Versuchen nicht gelang, ähnlich dem Cy5.5 eine selektiv N-terminale Proteinmarkierung zu erreichen, wurde der Farbstoff in einer zweistufigen Reaktion umfunktionalisiert. Ziel war es, ihn anschließend über eine SH-reaktive Maleimidgruppe an Lhcb-1 binden zu können.

Dazu wurde NIR-Cy in der ersten Reaktionsstufe mit Hexylendiamin (HDA) versetzt. HDA kann über seine primären Aminogruppen mit der Isothiocyanatgruppe des Farbstoffs reagieren. Ein Vernetzen zweier Farbstoffe durch HDA wurde durch einen nur 5-fachen HDA-Überschuß minimiert. Nicht farbstoffgebundenes HDA wurde anschließend durch eine Farbstoffsuspendierung in THF eliminiert. HDA ist in THF gut löslich, NIR-Cy dagegen überhaupt nicht. Eine ähnliche Aufreinigung wurde durch das Lösen des Farbstoffs in Wasser mit einer anschließenden Überschichtung mit Chloroform erreicht. Nur HDA sollte in die Lösungsmittelphase übertreten.

In der zweiten Reaktionsstufe wurde HDA-NIR-Cy mit Succinimidyl 4-[*p*-maleimidophenyl]-butyrat (SMPB) zur Reaktion gebracht. SMPB ist ein Crosslinker mit einer Maleimid- und einer Succinimidylgruppe. Die Succinimidylgruppe des SMPB reagierte im Versuch mit der primären Aminogruppe des an NIR-Cy gekoppelten HDA, so daß anschließend ein SH-reaktiver Farbstoff vorlag (vgl. Abb. 3.1, Kapitel 3.1.2.3). Als günstig für die Umfunktionalisierung erwiesen sich Farbstoffmengen bis 100 nmol.

Methode

100 nmol NIR-Cy in 100 µl Wasser wurden mit einem 5-fach molaren Überschuß einer 20 mM HDA/HCl-Lösung, pH 9,0 (zum Einstellen des pH-Wertes ist 1 M HCl notwendig) zur Reaktion gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde mit 3,5 µl einer 50 mM NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 9,0 angehoben. Die Farbstofflösung inkubierte dann 2 h bei 37°C.

Um nach Beendigung der Reaktion nicht gebundenes HDA von NIR-Cy abzutrennen, wurde der Farbstoff im Stickstoffstrom vollständig getrocknet und anschließend in THF resuspendiert. Dies gelang am besten durch mechanische Zerkleinerung des Farbstoffpellets mit der Pipettenspitze nach einer fünfminütigen Ultraschallbehandlung. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt, indem das Farbstoffpellet 2 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und anschließend erneut mit frischem THF versetzt wurde.

Um die Reinigung zu vervollständigen, wurde das NIR-Cy-Pellet im Anschluß in 10 µl Wasser gelöst und mit Chloroform überschichtet. Durch starkes Vortexen wurde eine Emulsion gebildet, die sich nach einigen Sekunden wieder entmischte. Auch dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Der Farbstoff wurde anschließend im Stickstoffstrom getrocknet und stand für den zweiten Reaktionsschritt zur Verfügung.

Dazu wurde der Farbstoff in 100 µl 100 mM NaP pH 7,7 gelöst und mit einem 5-fach molaren Überschuß einer 25 mM SMPB-Lösung in THF versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges SMPB in gleicher Weise wie HDA entfernt und der Farbstoff getrocknet. Eine Proteinmarkierung mit dem hergestellten Konstrukt fand immer direkt im Anschluß an die Umfunktionalisierung statt.

Proteinreduktion und Markierung

Prinzip

Die zur Farbstoffmarkierung verwendeten Klone S3C und S3Ch besitzen ein singuläres Cystein (vgl. Kapitel 2.2), welches zu Beginn der Farbstoffreaktion reduziert vorliegen muß. Tris(-2-cyanoethyl)-phosphin (TCEP) kann Cystingruppen zu Cystein reduzieren, ohne selbst in größerem Maße (Mitteilung von C. Huschenbett) mit einer SH-funktionellen Farbstoffgruppe zu reagieren.

Methode

- 1 Volumenteil Lhcb-1 in 1% SDS, Konzentration 10 µg/µl
- + 2 Volumentteile 100 mM NaP-Puffer, pH 7,0
- + 1 Volumentteil 10% OG
- + 6 Volumentteile H₂O
- + 1/5 Volumentteil 100 mM TCEP (Endkonzentration 2 mM)

Das Reaktionsgemisch wurde 15 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion danach kurz auf Eis abgestoppt. Der SH-reaktive Farbstoff wurde zugegeben und die Reaktion mindestens 12 h bei 4°C durchgeführt. 100 nmol Farbstoff genügte zur Markierung von 100 µg Protein. Ein vollständiges Lösen des NIR-Cy in dieser Proteinumgebung gelang nicht.

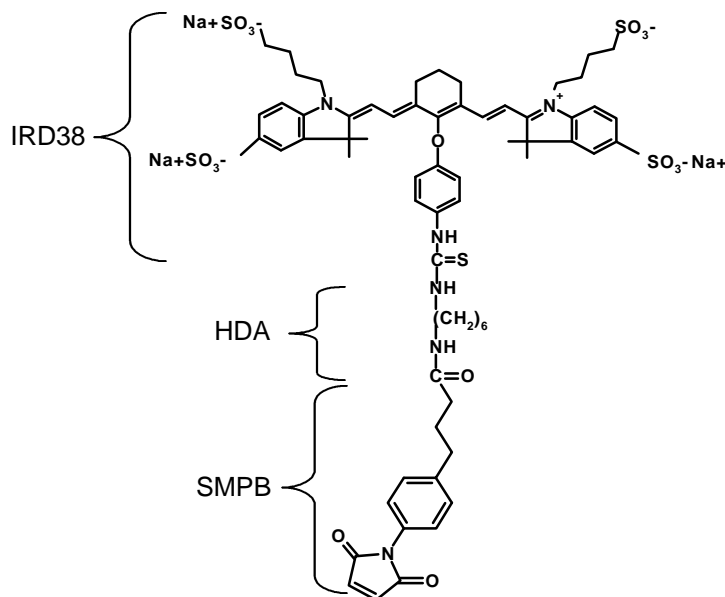
Eine längere Reduktionszeit des Proteins oder eine Markierungsreaktion bei Raumtemperatur bzw. 37°C führten zu keiner Verbesserung der Markierungsausbeute.

3.1.2.3 IRD38-Markierungsansatz

Prinzip

IRD38 wurde nach dem selben Prinzip wie NIR-Cy umfunktionalisiert, da auch hier eine selektive N-terminale Proteinmarkierung über die vorhandene Isothiocyanatgruppe nicht gelang. Besondere Vorsicht war bei dieser Farbstoffmodifikation geboten, da hohe pH-Werte und primäre Aminogruppen den Farbstoff umlagern konnten zum „Blue product“ (vgl. Kapitel 4.1.2). Daher wurde die Umfunktionalisationsrezeptur des NIR-Cy etwas verändert.

Abb. 3.1: IRD38, funktionalisiert mit einer Maleimidgruppe



Methode

In der ersten Reaktionsstufe wurden 100 nmol IRD38 in 100 μ l 100 mM NaP pH 8,2 mit HDA zur Reaktion gebracht. Der pH-Wert wurde nicht durch Zugabe von NaOH angehoben. Das Reaktionsgemisch inkubierte 3 h bei 37°C.

Alle weiteren Reaktionsschritte waren identisch mit denen der NIR-Cy-Umfunktionalisierung. Auch die Proteinmarkierung erfolgte gleich. IRD38 war jedoch im Gegensatz zu NIR-Cy im Protein/Detergensmedium gut löslich.

3.1.2.4 Maleimido-BTI-Markierungsansatz

Prinzip

Maleimido-BTI kann mit der reduzierten SH-Gruppe des Lhcb-1 reagieren. Die Reaktion mußte ähnlich der Rekonstitutionsreaktion durch schnelles Zusammenpipettieren der Protein- und Farbstofflösung erfolgen, da der Farbstoff sehr stark hydrophob ist und sonst selbst in der Detergensumgebung aggregiert wäre. Nicht proteingebundenes Maleimido-BTI neigte in allen Versuchen zur Aggregation und konnte generell nicht über längere Zeit in einer wäßrigen Umgebung in Lösung gehalten werden.

Methode

- 1 Volumenteil S3C oder S3Ch in 1% SDS, Konzentration ca. 10 μ g/ μ l
- + 2 Volumentile 100 mM NaP, pH 7,0
- + 1 Volumenteil 10% OG
- + 6 Volumentile H₂O
- + 1/5 Volumenteil 100 mM TCEP (2 mM Endkonzentration)

Das Reaktionsgemisch wurde 15 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion danach kurz auf Eis abgestoppt. Die Farbstoffzugabe erfolgte im direkten Anschluß mit einem 12,5-fachen Überschuß Maleimido-BTI in THF auf dem Vortexer. Als Standardansatz wurden 20 μ g Protein (ca. 1 μ g/ μ l Endkonzentration) mit 10 nmol Maleimido-BTI in 2 μ l THF versetzt. Größere Proteinmengen konnten nicht zur Markierungsreaktion verwendet werden, da dann die Gefahr der Farbstoffaggregation stark zunahm. Der Reaktionsansatz inkubierte mindestens 2 h bei 37°C.

3.1.3 Aufreinigung des farbstoffmarkierten Lhcb-1

Es galt für die nachfolgenden Experimente, das farbstoffmarkierte Lhcb-1 vom unmarkierten Protein und/oder ungekoppelten Farbstoff abzutrennen. Proteinfällung und präparative Gelelektrophorese waren dazu die Methoden der Wahl.

3.1.3.1 Fällung

Prinzip

Durch die Zugabe des Lösungsmittels Aceton und der gleichzeitigen Ansäuerung der Umgebung wurden Lhcb-1-BTI, -NIR-Cy und -IRD38 aus der Detergensumgebung ausgefällt. Mit Ausnahme des BTI-Farbstoffes verblieb der ungekoppelte Farbstoff dabei im Lösungsmittelüberstand.

Methode

- 1 Volumenteil Lhcb-1-Lösung
- + 0,1 Volumenteil 100 mM Essigsäure
- + 2,3 Volumentteile 100% Aceton

wurden mindestens 30 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe 15 min bei 4°C und maximaler Umdrehung in der Hettich-Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Im Pellet befand sich das markierte Protein.

Im Fall des NIR-Cy und IRD38 wurden einige Waschschriffe angeschlossen, um nicht kovalent ans Protein gebundenen Farbstoff möglichst komplett abzutrennen. Dafür wurde das Protein zunächst in 70% kaltem Ethanol im Ultraschallbad (ca. 5 min) resuspendiert und wieder abzentrifugiert (5-10 min bei 4°C). Dieser Waschschriff wurde $2\times$ mit 100% Ethanol (-20°C) und $5\times$ mit DMSO (jetzt Zentrifugation bei 10°C) wiederholt. Da in DMSO ein großer Proteinverlust zu beobachten war (entweder durch zu feine Resuspension oder Lösen des Proteins im Lösungsmittel), wurde die Fällung für IRD38 weiter optimiert.

Nach $1\times$ waschen mit 70% Ethanol und $2\times$ 100% Ethanol wurde das Proteinpellet in 1% SDS und 100 mM LiBorat pH 9,0 gelöst (bei einer Proteinkonzentration von ca. $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$) und ein zweites Mal nach obigem Rezept gefällt. Nach dieser Fällung wurde das Proteinpellet $2\times$ mit 100% Ethanol gewaschen und nur jeweils 1 min abzentrifugiert. Das Protein wurde in diesen kurzen Zentrifugationsschritten pelletiert, ebenfalls unlösliche Farbstoffaggregate verblieben aber noch im Überstand.

Da der BTI nicht aceton- oder ethanollöslich war, wurde auf Waschschriffe nach der Proteinfällung zur Farbstoffabtrennung verzichtet.

Lhcb-1-BTI und Lhcb-1-NIR-Cy wurden nach den Reinigungsschritten in 2% SDS und 100 mM Tris pH 9,0 aufgenommen, Lhcb-1-IRD38 in 2% SDS und 100 mM NaP, pH 8,0. Insgesamt wurde immer eine Proteinkonzentration von ca. $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt (die Proteinmenge wurde nach den Waschschriffen mit einer 80%igen Ausbeute des eingesetzten Lhcb-1 abgeschätzt).

Lhcb-1-IRD38 wurde in dieser Form für die Rekonstitution verwendet. Eine weitere Reinigung des markierten Proteins vom unmarkierten war aufgrund der Sensibilität des Farbstoffs gegen primäre Aminogruppen und/oder hohen pH-Wert nicht möglich. Lhcb-1-BTI, -NIR-Cy und -Cy5.5 konnten dagegen in einer präparativen Gelelektrophorese weiter aufgereinigt werden.

3.1.3.2 Präparative Gelelektrophorese

Prinzip

Farbstoffmarkiertes Lhcb-1 zeigte in analytischen Polyacrylamidgelen einen Laufunterschied gegenüber unmarkiertem Protein. Lhcb-1-NIR-Cy und -Cy5.5 zeigten eine Verzögerung im Gellauf aufgrund des zunehmenden Molekulargewichts. Lhcb-1-BTI zeigte eine Beschleunigung vermutlich ausgelöst durch die Bindung einiger SDS-Moleküle an den stark hydrophoben Farbstoff. Dieser Laufunterschied konnte zur Aufreinigung des markierten Lhcb-1 im präparativen Maßstab genutzt werden. Nicht gebundener Farbstoff wurde gleichfalls aufgrund seines sehr viel schnelleren Migrationsverhaltens abgetrennt.

Verwendet wurde ein zylinderförmiges SDS-Polyacrylamidgel (System nach Laemmli, 1970), auf dem die Auftrennung des farbstoffmarkierten Lhcb-1 von unmarkiertem Protein sowie ungekoppeltem Farbstoff erfolgte. Die in einzelne Fraktionen separierte Probe wurde vom Gelende her über ein Pumpensystem abgesaugt und mittels Fraktionssammler in Mikrotiterplatten aufgefangen. Variabel bei diesem System waren neben Geldimension und Zusammensetzung die Pumpgeschwindigkeit (40 $\mu\text{l}/\text{min}$ sollten jedoch nicht unterschritten werden) und die Fraktionsgröße (μl - bis ml-Bereich).

Methoden

Zur Aufreinigung von Lhcb-1-Cy5.5 wurde ein 20%iges Polyacrylamidgel verwendet, zur Aufreinigung von Lhcb-1-BTI und Lhcb-1-NIR-Cy war ein 15%iges Trenngel ausreichend.

Gelzusammensetzung:

Trenngel (5,1 ml)	Sammelgel (6,6 ml)
15% bzw. 20% Polyacrylamid (Acrylamid:Bisacrylamid = 30:1) 410 mM Tris/HCL pH 8,8 0,06% APS 0,04% TEMED	4,7% Polyacrylamid (Acrylamid:Bisacrylamid = 30:1) 130 mM Tris/HCL pH 6,8 0,045% APS 0,045% TEMED

Es wurde ein 8 cm hohes Trenngel gegossen und mit 2-Butanol überschichtet. Nach Auspolymerisieren des Gels (1-2 h) wurde das Butanol abgesaugt, die Lösungsmittelreste mittels H_2O entfernt und das Sammelgel gegossen. Die fertige Gelsäule wurde nach 1-2 h gründlich mit H_2O gespült und in die Elektrophoresekammer eingesetzt.

Laufpuffer (ca. 800 ml pro Lauf):

50 mM Tris
384 mM Glycin
0,1% SDS
1 mM EDTA

Probe:

100-200 μg markiertes Protein wurde in die präparative Gelelektrophorese eingesetzt. Dazu wurden die Proteinproben mit 1/3 bis 1/4 Volumenteil Sparmix ohne Bromphenolblau versetzt. Lhcb-1-Cy5.5 und Lhcb-1-NIR-Cy wurden direkt auf das Gel aufgetragen. Lhcb-1-BTI wurde zuerst 2 min gekocht, um Protein/Farbstoffaggregate zu lösen und anschließend 2 min bei RT und maximaler Umdrehung in der Tischzentrifuge abzentrifugiert.

Versuchsbedingungen:

Lauf bei konstanter Stromstärke	5 mA (300V als obere Spannungsgrenze determiniert)
Elektrophoreselauf	3-4 h bis zum Beginn der Fraktionssammlung. Diese startete, wenn die Laufmittelfront das Gel verließ. Das Laufende wurde dann nach 14 h 24 min erreicht, wenn die 3 × 96 Vertiefungen der Mikrotiterplatten gefüllt waren.
Pumpendurchfluß	40 µl/min
Fraktionssammlung	je 3 min (120 µl) über das Programm „Time Windows Collection Method“ in 3 „96 well“-Mikrotiterplatten (insg. 288 Vertiefungen und damit 288 Proben)
Rack	#3 (Geräteinterne Bezeichnung, um Fraktionen in Mikrotiterplatten aufzufangen)

Detektion:

Nach der präparativen Gelelektrophorese wurde das markierte Protein über die Farbstoffabsorption oder Fluoreszenz bestimmt. Die Farbstoffabsorption wurde in einem Mikrotiterplatten-Absorptionsmeßgerät detektiert (vgl. 3.1.4.2) oder mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Fluorimeters bestimmt (vgl. Wolf, 1998).

Fluoreszierende bzw. absorbierende Fraktionen wurden in einer analytischen Polyacrylamid-gelelektrophorese weiter auf die Reinheit des markierten Proteins hin untersucht (vgl. Kapitel 4.2.4 und 3.1.4.1). Dazu wurden aus jeder 5. Mikrotiterfraktion 50 µl Probe entnommen und mit Hilfe der Speed Vac auf die Hälfte aufkonzentriert (5-10 min unter Zuschaltung der Heizung).

3.1.4 Detektion des farbstoffmarkierten Lhcb-1

3.1.4.1 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Prinzip

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Gelelektrophoresesysteme verwendet.

Um farbstoffmarkiertes Lhcb-1 von unmarkiertem Protein zu trennen und damit den Markierungsgrad verschiedener Proteinansätze zu überprüfen, wurde eine SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). In diesem Gelelektrophoresesystem erfolgt die Proteinauftrennung im wesentlichen über das Molekulargewicht. Eine Kopplung von Farbstoff an das Lhcb-1 erhöhte das Molekulargewicht und erzeugte daher eine Varianz im Laufverhalten des Proteins. Um LHCII-Komplexe möglichst schonend im Gel aufzutrennen, wurde eine schwach denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese mit Na-Desoxycholat als einzigem Detergens durchgeführt. Dieses Gelsystem diente der Charakterisierung von LHCII-Komplexen unterschiedlichen SDS-Gehalts.

Methode

I.) SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (PAGE)

Es wurden voll denaturierende Polyacrylamidgele des Auftrennungssystem nach Laemmli (1970) verwendet.

Gelzusammensetzung

Trenngel (Trennstrecke ca. 5 cm)	Sammelgel (ca. 1,5 cm Höhe)
15% Acrylamid (Acrylamid:Bisacrylamid = 30:1) 400 mM Tris/HCl pH 8,8 10% Glycerin	4,5% Acrylamid (Acrylamid:Bisacrylamid = 30:1) 130 mM Tris/HCl pH 6,8 10% Glycerin
0,07% APS 0,05% TEMED	0,05% APS 0,05% TEMED

Acrylamid, Tris/HCl, Glycerin und eine entsprechende Menge Wasser wurden gemischt und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast (notwendige Gellösung für 10 Gele: Trenngel ~55 ml, Sammelgel ~35 ml). Nach Zugabe von APS und nachfolgend TEMED wurde das Trenngel in vorbereitete Gelkammern gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach Polymerisationsende wurde das Wasser abgesaugt, ein Sammelgel gegossen und Kämme zur Bildung von Geltaschen eingesteckt.

Laufpuffer

25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1% SDS
0,5 mM EDTA

Probe

Die aufzutragenden Proteinproben wurden mit 1/3-1/4 Volumenteilen Sparmix versetzt. Der Elektrophoreselauf fand unter Wasserkühlung im Sammelgel bei 60 V, im Trenngel bei 100-200 V statt. Die Spannung wurde erst auf über 140 V angehoben, wenn die Lauffront schon mindestens 2 cm in das Trenngel eingelaufen war.

Detektion/Gellagerung

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde bei Vorlage von farbstoffmarkiertem Protein die betreffende Bande mit einem Skalpell markiert und im Anschluß daran eine Coomassiefärbung durchgeführt (vgl. Wolf, 1998). Das fertige Gel wurde zwischen zwei Cellophanschichten in einem Geltrockner entwässert (vgl. Wolf, 1998).

II.) Schwach denaturierende Gelelektrophorese

Es wurde das schwach denaturierende Gelelektrophoresesystem von Sukenik (1992) modifiziert, um es für Versuche in Kapitel 6.2.2 einsetzen zu können.

Gelzusammensetzung

Trenngel (Trennstrecke ca. 6 cm)	Sammelgel (ca. 2 mm Höhe)
10% Acrylamid (Acrylamid:Bisacrylamid = 30:1) 0,4 M Tris/HCl pH 8,8 0,274 M Saccharose 0,05% Na-Desoxycholat	4,5% Arylamid (Acrylamid:Bisacrylamid = 30:1) 0,13 M Tris/HCl pH 8,8 0,274 M Saccharose 0,025% Na-Desoxycholat
0,07% APS 0,05% TEMED	0,05% APS 0,05% TEMED

Die Gele wurden gemäß I.) gegossen.

Laufpuffer

10 mM Tris
60 mM Glycin
0,05% Na-Desoxycholat

Probe

Die Proteinproben wurden mit 10-20% Glycerin beschwert und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf fand über Nacht bei 2 mA unter 4°C-Kühlung statt.

Detektion/Lagerung

siehe I.

3.1.4.2 Absorptionsmessung mit dem Mikrotiterplatten-Absorptionsmeßgerät

Prinzip

Um das nach einer präparativen Gelelektrophorese aufgereinigte farbstoffmarkierte Lhcb-1 in den 288 Vertiefungen der drei Mikrotiterplatten zu detektieren, wurde die Farbstoffabsorption der einzelnen Proben in einem Mikrotiterplatten-Absorptions-Meßgerät (SPECTRAMaxPLUS der Firma Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, California) überprüft.

Methode

Die einzelnen Mikrotiterplatten wurden mit der SOFTmax®PRO-Software (Version 3.1.1) mit folgenden Meßparametern untersucht.

Art der Messung	Endpunktmessung
Absorptionsmaximum	Absorptionsmaximum des zu detektierenden Farbstoffs
„Path check“	Aus
„Automix und Blanking“	Aus
„Auto Calibrate“	An
„Strips“	„Read entire Plate“

Die detektierten Absorptionen der einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden zu einem Elutionsprofil graphisch zusammengestellt.

3.2 Herstellung von aufgereinigten farbstoffmarkierten LHCII-Komplexen

3.2.1 Aufkonzentration der Lhcb-1-Proben mittels Ultrafiltration

Prinzip

Proben geringer Proteinkonzentration, wie nach einer präparativen Gelelektrophorese, können mittels Ultrafiltration aufkonzentriert werden. Dazu wird die überschüssige Flüssigkeit sowie störende Puffersubstanzen mittels Zentrifugalkraft durch eine Membran gepreßt, während das Protein im Überstand verbleibt.

Methode

Lhcb-1-BTI, -Cy5.5 und -NIR-Cy, aufgereinigt durch die präparative Gelelektrophorese (Kap.3.1.3.2), mußte vor der weiteren Verwendung aufkonzentriert werden, da 10-20 µg des gereinigten Proteins in ca. 1 ml Elektrophoresepufferlösung vorlag und damit für eine Rekonstitution zu gering konzentriert war.

Dazu wurde die Proteinprobe 30 min in Filtron®Röhrchen (30 kDa-Ausfluß, Filtron GmbH, Karlstein) bei 6000 rpm (3000×g) und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Um das Protein möglichst vollständig vom Elektrophoresepuffer zu befreien, wurde der Proteinüberstand anschließend mit 1 ml 100 mM Tris/HCl pH 9,0 versetzt und 60-75 min bei 6000 rpm abzentrifugiert. Im Überstand verblieben am Ende 20-30 µl Proteinlösung, welche mit 10 µl 10% SDS versetzt wurden, um an der Filtronmembran aggregiertes Protein zu lösen (Filtronröhrchen dazu 1 min vortexen). Die Filtronröhrchen wurden zur erneuten Zentrifugation (5 min, 3000 rpm) mit einem Deckel verschlossen und umgedreht. Die Proteinlösung eluierte dadurch in diesen Deckel und konnte abpipettiert werden. Durch Zugabe von 100 mM Tris pH 9,0 wurde ein Endvolumen von 50 µl eingestellt und damit auch eine SDS-Konzentration von mindestens 2% (vermutlich lag die Detergentskonzentration höher, da das in der Elektrophoreselösung vorhandene SDS nicht vollständig abfiltriert wurde aufgrund seiner geringen kritischen mizellären Konzentration (CMC)).

3.2.2 Rekonstitution

Prinzip

Es kann eine Rückfaltung des Lhcb-1 durch Zugabe von Chlorophyllen und Xanthophyllen sowie einer darauffolgenden Veränderung der Detergenumgebung induziert werden (Paulsen *et al.*, 1993). Man spricht hierbei von einer Detergenswechsel-Rekonstitution.

Methode

Markiertes bzw. unmarkiertes Lhcb-1 einer Stoffmenge von 5 - 25 µg wurden in 50 µl 100 mM Tris pH 9,0 und 2% SDS vorgelegt. Lhcb-1-IRD38 wurde in 2% SDS und 100 mM NaP pH 8,0 zur Reaktion gebracht.

+ 5 µl DTT 10 mM

+ 5 µl Pigment (20 – 30 µg Chlorophyll, sowie Xanthophyll) in Ethanol

wurden auf dem Vortexer 30 min gemischt

+ 7,5 µl 10% OG

5 min RT

+ 7,5 µl KCl 2M

20 min Inkubation auf Eis

Nach 8 min Zentrifugation bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit in der Hettich-Kühlzentrifuge lag der gefaltete Komplex im Überstand vor. In allen Experimenten wurde auf einen minimalen Chlorophyllüberschuß von 2-3 fach über der notwendigen Chlorophyllmenge (12 - 14 Chlorophylle pro Lhcb-1) geachtet. Es wurden Rekonstitutionen mit zwei verschiedenen molaren Pigmentverhältnissen durchgeführt.

Chla : Chlb = 1 : 1 bzw. 3 : 1

Das Verhältnis von Chlorophyll zu Xanthophyll war immer 1 : 0,15.

Die Gewinnung der Chlorophylle und Xanthophylle erfolgte aus Erbsen nach dem Laborprotokoll der AG Paulsen (vgl. Fey, 2001). Genutzt wurde für ein Chla:Chlb-Verhältnis von 3:1 Totalextrakt, der mit Hilfe von reinen Xanthophyll-Aliquots auf das gewünschte Chl:Xanthophyll-Verhältnis angehoben wurde.

3.2.3 Dichtegradientenzentrifugation

Prinzip

Um ungefaltetes Protein und ungebundenes Pigment von den LHCII-Komplexen abzutrennen, wurde eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation an die Rekonstitution angeschlossen. Längere Wartezeiten zwischen Rekonstitution und Ultrazentrifugation wurden vermieden, da sonst in der eigentlich aufgereinigten LHCII-Bande photometrisch sichtbare Aggregate auftraten.

Methode

Es wurden 2 Methoden verwandt:

	Methode A	Methode B
Gradientenzusammensetzung	0,6 M Saccharose 0,1% n-Dodecyl-β-D-maltosid (LM) 5 mM Tricine/NaOH, pH 7,8 Gradienten in 3 Einfrier-Auftauzyklen formieren	0,4 M Saccharose 0,1% LM 5 mM Tricine/NaOH, pH 7,8 Gradienten in 1-2 Einfrier-Auftauzyklen formieren
Laufbedingungen	16 h bei 345.000×g (58.000 rpm in Beckmann-Zentrifuge)	16 h bei 300.000×g (54.000 rpm in Beckmann-Zentrifuge)

Es wurden in der Regel 10-20 µg (maximal 50 µg) Protein einer Rekonstitution auf 4 ml große Zentrifugenröhrchen aufgetragen und über den Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt. Nach der Zentrifugation konnte der aufgereinigte LHCII als einzelne Bande (vgl. Kapitel 4.2.1) abgezogen werden.

Um LHCII des Klons Lys6 über einen Dichtegradienten aufzureinigen, wurde den Saccharosegradienten 0,1 mM TCEP zugesetzt zur Vermeidung von LHCII-Dimeren.

3.2.4 Photometrische Bestimmung des LHCII

Die Absorption von LHCII, aufgereinigt über eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation, wurde an einem UV-Vis-Spektrophotometer (UV-2101PC von Shimazu) bestimmt. Um Fusseln etc. von der LHCII-Probe abzutrennen, wurden alle Proben vor der Messung 1 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert.

Meßparameter

Meß-Modus	Absorption
Wellenlängenbereich [nm]	350-800
Meßgeschwindigkeit	Medium
Spaltbreite [nm]	0,5
Increment [nm]	1

3.2.5 Fluoreszenzmessungen

Prinzip

Die Fluoreszenzspektroskopie diente in dieser Arbeit dem Nachweis eines Energietransfers. Nachgewiesen werden konnte zum einen die Intaktheit des LHCII über die Effizienz des komplexinternen Energietransfers von Chlb nach Chla (vgl. Kapitel 4.2.5). Zum anderen konnte der Energietransfer von komplexgebundenem Chla auf einen externen Energieakzeptor (NIR-Cy, IRD38, Cy5.5 oder Maleimido-BTI) quantifiziert werden.

Methode

Emissions- und Excitationsspektren wurden mit dem Fluoromax-2, Programm Datamax (Jobin Yvon, Grasbrunn, Germany), bei 297K und 77K gemessen. Um den Energietransfer von Chlb nach Chla zu bestimmen, wurde Chlb bei 460 nm angeregt und das Emissionsspektrum gemessen. Der Energietransfer von Chla auf den angekoppelten Farbstoff wurde in Emissionsspektren durch Excitation bei 410, 430 oder 437 nm quantifiziert. Dabei wurde immer darauf geachtet, daß die Chlorophyllabsorption in der Excitationswellenlänge $<0,1$ war, um Reabsorption während der fluorometrischen Vermessung zu minimieren.

Parameter:

	Integrationszeit [s]	Spaltbreite für Anregung und Emission [nm]	Increment [nm]	„Lampen-Level“ (Lampenintensität)
Emissionsspektren	0,1	3/3	0,5 - 1	2
Excitationsspektren	0,5	3/3	0,5 - 1	2

Von diesen Parametern abweichende Meßanordnungen werden an betreffender Stelle aufgeführt.

Es wurde das gemessene Spektrum immer gegen das Lampenspektrum („S/R“) und die wellenlängenabhängige Veränderung der Photomultipliersensitivität („ \times mcorrect“) korrigiert. Alle Energietransferexperimente mit LHCII-Farbstoffkomplexen fanden bei einem konventionellen Aufbau des Strahlenganges statt (das Fluoreszenzlicht wurde im rechten Winkel zur Anregungslicht detektiert). Die Versuche zur Immobilisierung des LHCII an TiO₂ oder an HRP (vgl. Kapitel 3.4) fanden mit einem „Front face“-Aufbau des Fluorometers statt (zum Meßprinzip vgl. Reinsberg, 2000). Dazu wurden die entsprechend beschichteten Glasplatten direkt in dem Küvettenplatzhalter positioniert.

Messungen bei 77 K fanden in einer eigens dafür angefertigten Apparatur bestehend aus einem Dewar und einem Meßtisch statt. Als Küvette dienten bei diesem Versuch Kunststoffröhrchen für die Ultrazentrifuge (Beckman Ultra-ClearTM Centrifuge Tubes 5*41 mm), da sie durch ihre Flexibilität eine Glasbildung ohne Eiskristalle ermöglichten. Ihre Eigenfluoreszenz war im sichtbaren Bereich vernachlässigbar. Eine Glasbildung der zu charakterisierenden Proben wurde durch den Zusatz von Glycerin (60% Endkonzentration) erreicht.

3.2.6 Trypsinverdau

Prinzip

Trypsin ist eine Protease, welche Polypeptide an Arginin und Lysin von carboxyterminaler Seite her schneidet (Stryer, 1995). Lhcb-1 wird durch Trypsin nahezu vollständig abgebaut. Nach Rekonstitution kann bei maturem Lhcb-1 dagegen nur ein 1 kDa großer Abschnitt des N-terminus verdaut werden, der größte Teil des Proteins ist proteasegeschützt. Die Ursache dieses Phänomens ist nicht genau bekannt, entweder schützen die Pigmente angreifbare Peptidbindungen vor der Protease, oder aber sie induzieren eine kompakte Proteinfaltung, in der mögliche Angriffsstellen vor Trypsin verborgen sind (Paulsen *et al.*, 1993). Letzterer Möglichkeit wird eine größere Wahrscheinlichkeit zugesprochen.

In dieser Arbeit diente der Trypsinverdau zum einen dazu, N-proximal oder N-terminal an den LHCII gebundenen Farbstoff abzutrennen und damit den Energietransfer von Chlorophyll auf den Energieakzeptor zu unterbinden. Zum anderen wurde es auch zur vollständigen, unspezifischen Proteinzerstörung eingesetzt (Kapitel 4.2.1.1).

Methode (zum N-terminalen Verdau)

200 μ l einer LHCII-Lösung, aufgereinigt durch einen Saccharose-Dichtegradienten + 22 μ l Trypsin (1 mg/ml) in 10 mM Tricine pH 8,0 und 0,2 mM EDTA wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden sofort Emissionsspektren unter selektiver Anregung von Chla gemessen. Ein Trypsinverdau in einer 1% SDS-haltigen Umgebung scheiterte, da die Protease sich unter diesen Bedingungen selbst verdaute.

3.3 Bestimmung des Energietransfers von Chla auf einen Farbstoff in LHCII-Farbstoff-Komplexen

Generell existieren zwei Möglichkeiten der Bestimmung des RET. So kann ein Energietransfer einmal über eine Verminderung der Fluoreszenzquantenausbeute des Donors ermittelt werden (Kapitel 3.3.1, das sog. Donorquenching) und zum anderen über das Auftreten einer Akzeptorfluoreszenz ohne direkte Akzeptorexcitation (Kapitel 3.3.2, die stimulierte Akzeptorfluoreszenz).

3.3.1 Bestimmung des Donorquenchings

Prinzip

Bei dieser Methode der Energietransferbestimmung geht man davon aus, daß sich die Quantenausbeute vom Donor durch Energietransfer auf den Akzeptor verringert. Unspezifische Umgebungseffekte (die Anwesenheit vom Akzeptor verändert unspezifisch die Umgebung des Donors und damit dessen Quantenausbeute) bleiben dabei unberücksichtigt.

Methode

Der Energietransfer kann nach dieser Methode leicht bestimmt werden, wenn die Donor- und Akzeptor-Fluoreszenz nicht oder nur geringfügig überlappen wie es bei LHCII-NIR-Cy oder LHCII-IRD38-Komplexen zu finden ist. Der Energietransfer konnte hier nach der einfachen Formel

$$\text{Energietransfer [\%]} = \left(1 - \frac{\int \text{Chla - Fluoreszenz von LHCII - Farbstoff - Komplexen}}{\int \text{Chla - Fluoreszenz von LHCII - Komplexen}} \right) \cdot 100$$

berechnet werden. Die Integrationsgrenzen waren für alle Experimente 625 nm und 700 nm. Aufgereinigte farbstoffmarkierte sowie unmarkierte LHCII-Komplexe wurden dazu bei 410 oder 437 nm auf gleiche Absorption eingestellt. Da freies Pigment nach Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt war, wurden hiermit beide Proben auf gleichen LHCII-Gehalt eingestellt. Die Einstellung erfolgte in der Chlorophyll-Soretbande, weil hier die Farbstoffe nahezu keine Absorption zeigten. Die Chlorophyllabsorption wurde auf einen Wert unterhalb von 0,1 eingestellt, um in den nachfolgenden Fluoreszenzmessungen Reabsorptionsphänomene minimieren zu können. Im folgenden wurden mit beiden Proben Emissionsspektren bei gleicher Chla-Excitationswellenlänge gemessen.

In LHCI-BTI-Komplexen überlappte die langwellige Chla-Fluoreszenz (685 – 700 nm) mit der Farbstoff-Fluoreszenz, so daß der Energietransfer nur über einen Vergleich der maximalen Chlorophyll-Fluoreszenz einer Wellenlänge (bei 680 bzw. 682 nm) erfolgte (vgl. Kapitel 4.2.4.2).

In den LHCII-Cy5.5-Komplexen differierten Donor- und Akzeptor-Fluoreszenz nur um 15 nm. Eine Dekonvolution der Gesamtfluoreszenz in die Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzanteile war daher essentiell. Da kommerzielle Programme nicht die Möglichkeit boten, Dekonvolutionen mit Hilfe von gemessenen Kurven durchzuführen, wurde eine 2-Faktoren-Analyse in Excel durchgeführt. Prinzip dieses Systems ist die Berechnung des Anteils von Donor- und Akzeptor-Fluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz im jeweiligen Emissionsmaximum.

Zur Anpassung der Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzanteile an die LHCII-Cy5.5-Fluoreszenz war eine Funktion der Chla- und der Cy5.5-Fluoreszenz notwendig. Es wurde dazu zum einen die Chla-Fluoreszenz in einem unmarkierten LHCII (bei 410 nm Excitation) und zum anderen die Cy5.5-Fluoreszenz (580 nm Excitation bei 297K und 640 nm Excitation bei 77K) in ungefaltetem Lhcb-1-Cy5.5 bestimmt.

Die Dekonvolution mittels 2-Faktoren-Analyse erfolgte nach folgende Formeln.

F_g = Fluoreszenz von LHCII-Farbstoffkonstrukt nach Chla-Anregung bei 410 nm
 F_{Chl} = Fluoreszenz von Chla in LHCII nach direkter Anregung
 F_{Cy} = Fluoreszenz von Lhcb-1-Cy5.5 nach direkter Farbstoffanregung
 F_{Chlfit} = errechnete Fluoreszenz von Chla in LHCII-Cy5.5 nach Anregung bei 410 nm
 F_{Cyfit} = errechnete Fluoreszenz von Cy5.5 in LHCII-Cy5.5 nach Anregung bei 410 nm

(Die Zahl hinter der Fluoreszenzspezifizierung gibt die Emissionswellenlänge an.)

$$\begin{aligned}
 \text{I.)} \quad & F_{g682} = K \times F_{g695} \\
 & F_{Chl682} = R \times F_{Chl695} \\
 & F_{Cy695} = T \times F_{Cy682}
 \end{aligned}$$

Die Faktoren K, R und T sind nur vom Kurvenverlauf der LHCII-, LHCII-Cy5.5- und Lhcb-1-Cy5.5-Fluoreszenzen abhängig und daher unabhängig von gemessenen Fluoreszenzintensitäten bestimmbar.

Es gilt weiterhin:

$$\begin{aligned}
 \text{II.)} \quad & F_{g682} = F_{Chlfit682} + F_{Cyfit682} \\
 & F_{g695} = F_{Chlfit695} + F_{Cyfit695}
 \end{aligned}$$

Durch Einsetzen der Formeln I. in die Gleichungen II. konnten die zwei notwendigen Faktoren des Dekonvolutionssystem errechnet werden ($F_{Chl/Cy}$ -Variablen wurden dazu den $F_{Chl/Cyfit}$ -Variablen gleichgesetzt):

$$\begin{aligned}
 \text{III.)} \quad & F_{Chlfit682} = (R(K \times T - 1) \times F_{g682}) / (R \times K \times T - K) \\
 & F_{Cyfit695} = ((T \times (K - R)) \times F_{g695}) / (1 - (R \times T))
 \end{aligned}$$

Die gefitteten Chla- und Cy5.5-Emissionskurven ergaben sich dann folgendermaßen:

$$\begin{aligned}
 \text{IV.)} \quad & F_{Chlfit}(600 - 800) = F_{Chl}(600 - 800) \frac{F_{Chlfit682}}{F_{Chl682}} \\
 & F_{Cyfit}(600 - 800) = F_{Cy}(600 - 800) \frac{F_{Cyfit695}}{F_{Cy695}}
 \end{aligned}$$

Die Güte der Dekonvolution wurde bestimmt, in dem das gemessene Emissionsspektrum von LHCII-Cy5.5 nach Chla-Anregung vom Summenspektrum aus errechneter Chlorophyll- und Cy5.5-Fluoreszenz subtrahiert wurde. Das Integral dieses Differenzspektrums wurde dann ins Verhältnis gesetzt mit dem gemessenen Emissionsspektrum und als Anpassungsfehler in Prozent angegeben.

Nach Dekonvolution der Gesamtfluoreszenz in die beiden zugrunde liegenden Spektren konnte auch hier nach obiger Formel zum Donorquenching der Energietransfer berechnet werden. Neben der Einstellung der LHCII-Cy5.5-Absorption auf die der LHCII-Referenz, wurden auch Denaturierungsexperimente durchgeführt. Ziel war es, das Donorquenching über die Zunahme der Chla-Fluoreszenz nach Unterbrechung des Energietransfers auf Cy5.5 in einer einzigen Probe zu bestimmen (vgl. Kapitel 4.2.1.1).

3.3.2 Bestimmung der sensibilisierten Akzeptorfluoreszenz

Prinzip

Der Energietransfer in Donor-Akzeptor-Systemen ist auch über das Auftreten der Akzeptor-Fluoreszenz bestimmbar. Wichtig hierfür ist eine selektive Anregungsmöglichkeit des Donors ohne gleichzeitige, direkte Akzeptorexcitation.

Methode

Gerade für die Bestimmung des Energietransfers in LHCII-Cy5.5-Konstrukten erwies es sich als optimal, die Quantifizierung des Übergangs mittels Bestimmung der sensibilisierten Akzeptorfluoreszenz durchzuführen. Nach einer starken Vereinfachung der Formel von Fairclough und Cantor (1978) wurde folgende Berechnung durchgeführt:

$$\text{Energietransfer [\%]} = \frac{\int \text{Cy5.5 - Fluoreszenz} / f_{\text{Cy5.5}}}{\int \text{Cy5.5 - Fluoreszenz} / f_{\text{Cy5.5}} + \int \text{Chla - Fluoreszenz} / f_{\text{Chla}}} \cdot 100$$

f_{Chla} und $f_{\text{Cy5.5}}$ sind in Kapitel 4.1 zusammengefasst. Die Integrationsgrenzen wurden mit 600 nm und 800 nm festgelegt. Bei 77K wurde für Cy5.5 die untere Grenze auf 650 nm angehoben, da das Lhcb-1-Cy5.5-Emissionsspektrum bei einer Excitationswellenlänge von 640 nm aufgenommen worden war.

Die Chla- und Cy5.5-Fluoreszenz wurde dem in die beiden Unterspektren dekonvolvierten LHCII-Cy5.5-Spektrum entnommen. Eine fluorometrische Vermessung des LHCII-Referenzspektrums oder aber eine Denaturierung der LHCII-Cy5.5-Probe wurde damit überflüssig.

Die obige Formel kann nur unter Postulierung zweier Annahmen verwendet werden:

- Die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors ändert sich nicht umgebungsabhängig bei Anwesenheit vom Akzeptor und umgekehrt, sondern ist spezifisch auf Energietransferprozesse zurückzuführen.
- Der Kurvenverlauf der Donor und Akzeptor-Fluoreszenz ändert sich nicht bei Vorlage beider Fluorophore in einem Komplex.

Neben der oben genannten Methode der Quantifizierung des Energietransfers durch die sensibilisierte Akzeptorfluoreszenz, ist bei Fairclough und Cantor eine weitere Methode beschrieben (1978).

Wenn in einem System die Donor- und Akzeptor-Fluoreszenz nicht überlappen, ist es möglich, den Energietransfer über einen Vergleich des Absorptionsspektrums mit dem Excitationsspektrums (Emissionswellenlänge ist die der maximalen Akzeptor-Fluoreszenz) einer Probe zu ermitteln. Dazu werden die beiden Spektren auf maximale Akzeptor-Absorption bzw. die direkte Akzeptor-Excitation normiert und anschließend der Donor-Anteil der Excitation mit dem der Donor-Absorption verglichen.

Bei den verwendeten LHCII-Farbstoffsystemen wurde diese Energietransferberechnungsmethode nur für LHCII-NIR-Cy verwendet (vgl. Kap.4.2.2.2) und folgende Formel angewendet.

$$\text{Energietransfer [\%]} = \frac{\int \text{Chla - Excitation}}{\int \text{Chla - Absorption}} \cdot 100$$

Um die Chla-Absorption und -Excitation bestimmen zu können, mußten die Absorptions- bzw. Excitationsspektren in die Chla und Chlb-Anteile dekonvolviert werden. Diese Anpassung erfolgte mit dem Programm „Datamax“, Unterprogramm „Curve fit“ am Fluoromax-2 durch die Annahme der Zerlegbarkeit der Chla und Chlb-Absorption bzw. Excitation in zwei Gaußkurven. Als Integrationsgrenzen wurden vor der Dekonvolution durch das Datamax-Programm 640 nm und 700 nm festgelegt.

3.3.3 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten der verwendeten Fluorophore

Der Extinktionskoeffizient aller verwendeten Farbstoffe wurde vom Hersteller in organischem Lösungsmittel bestimmt und diente in den Versuchen als Referenz zur Ermittlung des Extinktionskoeffizienten in Detergensumgebung bei 297K und 77K. Es wurden die Absorptionsmaxima gleicher Farbstoffmengen in Lösungsmittel und in Detergens (bei 297K und 77K) miteinander verglichen.

$$\text{Gesuchtes } \varepsilon \text{ (in Detergens)} = \text{bekanntes } \varepsilon \text{ (in Lösungsmittel)} \cdot \frac{E_{\text{max in Detergens}}}{E_{\text{max in Lösungsmittel}}}$$

ε = Extinktionskoeffizient

E = Extinktion

Die Extinktion des BTI in Detergens konnte nur an Lhcb-1-BTI gemessen werden, da der Farbstoff selbst nicht detergenschlüssig ist. Um die BTI-Menge zur Ermittlung des Extinktionskoeffizienten zu bestimmen, wurde die Lhcb-1-Menge densitometrisch in einem Polyacrylamidgel quantifiziert (vgl. Wolf, 1998). Da jedes Protein farbstoffmarkiert war, entsprach die Lhcb-1-Menge der BTI-Menge.

Der Extinktionskoeffizient des LHCII bei 77K wurde gleich dem der Farbstoffe bestimmt. Als Referenz diente hier der Extinktionskoeffizient bei 297K, gemessen von Kühlbrandt und Butler (1988).

3.3.4 Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute der verwendeten Fluorophore

Die Fluoreszenzquantenausbeute aller Chromophore wurde in relativen Messungen bestimmt. Dazu wurden zwei Farbstoffe (einer mit bekannter Quantenausbeute und einer, von dem diese bestimmt werden soll) bei einer Wellenlänge auf identische Absorptionswerte eingestellt und bei dieser Wellenlänge anschließend die Substanzen zur Fluoreszenz angeregt. Aus dem Vergleich der Integrale beider Emissionsspektren ließ sich nachfolgend die gesuchte Fluoreszenzquantenausbeute berechnen.

$$\text{Gesuchte } f = \text{bekannte } f \cdot \frac{\int \text{Emission des Farbstoff mit der zu bestimmenden } f}{\int \text{Emission des Farbstoff mit der bekannten } f}$$

f = Fluoreszenzquantenausbeute

Der zu erwartende Fehler einer solchen Messung hängt von mehreren Parametern ab:

1. Wie genau wurde die Quantenausbeute der Referenz bestimmt (absolute Messung der Quantenausbeute ist hier einer relativen Messung vorzuziehen)?
2. Wie homogen ist die zu untersuchende Probe (vgl. Kapitel 4.1.2)?
3. Wie genau kann die Fluoreszenzdetektion über den gesamten Emissionsbereich erfolgen (vgl. Kapitel 4.1.1)?
4. Wie groß ist die Äquivalenz der Meßparameter von Referenz und Probe? Je ähnlicher beispielsweise die Lösungsumgebung gewählt werden kann, desto präziser sind die errechneten Quantenausbeuten.

3.4 Immobilisation von LHCII-His6 an Ni-NTA-HRP

Um in Versuchen der Einzelmolekülspektroskopie LHCII-Komplexe in Detergens in einer definierten Orientierung charakterisieren zu können, wurde eine Proteinimmobilisation angestrebt. Ziel war es, LHCII-Mutanten (vgl. Kapitel 2.x) über einen „His6-tag“ an Glasoberflächen zu binden. Ein von der Firma Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden) vertriebenes Protein-Konjugat konnte die LHCII-Verknüpfung mit der gewünschten Oberfläche moderieren. Es handelt sich dabei um HRP (Horseradish-peroxidase-conjugated Ni-NTA), eine Meerrettich-Peroxidase, die ein Nickel-Nitrilotriessigsäurechelate trägt. HRP bindet spontan an Glasoberflächen und kann über seine Ni-NTA-Gruppe je zwei Histidine über deren freies Elektronenpaar am Stickstoff komplexieren (vgl. Kapitel 1.4.1).

3.4.1 Immobilisation von LHCII-His6 zur Charakterisierung im Fluoromax-2

Verwendete Puffer:

Puffer A	Puffer B	Puffer C
20 mM MOPS/KOH, pH 7,0	20 mM MOPS/KOH, pH 7,0	100 mM MOPS/KOH, pH 7,0
50 mM KCl	50 mM KCl	50 mM KCl
5 mM MgCl ₂	5 mM MgCl ₂	5 mM MgCl ₂
----	0,1% LM	0,1% LM
----	0,2 M Saccharose	0,2 M Saccharose

50 µl einer 0,8 µM HRP-Lösung in Puffer A wurden auf einen Objektträger pipettiert und 4 min bei RT inkubiert (Molekulargewicht von HRP = 42 kDa). Die Lösung wurde abpipettiert und die Prozedur erneut mit 50 µl der 0,8 µM HRP-Lösung wiederholt.

Im nächsten Schritt wurde nicht an die Glasoberfläche gebundene HRP durch eine Überschichtung mit 50 µl Puffer A in einer 4 minütigen Inkubation entfernt. Die Pufferlösung wurde im Anschluß mit einer Pipette abgesaugt und die Waschprozedur einmal wiederholt.

Nun wurden 50 µl einer von freiem Chlorophyll und ungefaltetem Protein gereinigten LHCII-His6-Lösung (Bezeichnung für jede LHCII-Mutante mit „His6-tag“) auf die HRP-

beschichtete Glasplatte pipettiert. LHCII-Monomere wurde nach Kapitel 3.2.2 hergestellt und nach Kapitel 3.2.3 aufgereinigt. LHCII-Trimere wurden von Huschenbett hergestellt (Huschenbett, 2001) und gemäß Kapitel 3.2.3 aufgereinigt. Native Trimere wurden in einigen Fällen als Kontrolle eingesetzt (His6-tag freie Komplexe) und nach Krupa *et al.* (1987) aus Erbsen isoliert. Eine Aufreinigung von freiem Chlorophyll erfolgte hier in gleicher Weise. Die LHCII-Konzentration lag in allen Fällen in der Größenordnung von 0,2 - 0,8 μM . Die His6-Bindung an HRP wurde durch eine 4 minütige Inkubation auf Eis induziert und der LHCII-Überstand nach Ablauf der Zeit abpipettiert. Auch dieser Reaktionsschritt wurde einmal wiederholt.

Zur Entfernung von ungebundenem LHCII wurde die beschichtete Glasplatte mit 50 μl Puffer B überschichtet und 4 min auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde abpipettiert und der Vorgang einmal wiederholt. Am Ende wurde die Glasplatte mit zwei Mal 700 μl Puffer B abgespült. Es wurde in allen Inkubationsschritten darauf geachtet, daß die HRP- bzw. HRP/LHCII-beschichtete Glasoberfläche nicht austrocknete. Auch bei einem Wechsel des Inkubationsmediums verblieb ein dünner Feuchtigkeitfilm auf der Oberfläche.

3.4.2 Immobilisation von LHCII-His6 zur Charakterisierung mittels Einzelmolekülspektroskopie

Um LHCII-His6 einzelmolekular zu charakterisieren, konnte nahezu die gleiche Immobilisationsprozedur, wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, verwendet werden. Im folgenden werden daher nur die Abweichungen dokumentiert.

LHCII-His6 wurde an ein Deckglas (Marienfeld 24×32 mm N°1) immobilisiert, welches nachfolgend die Oberseite einer 170 μm hohen Flüssigkeitszelle (BKS7-Glas) bildete. Damit konnten die LHCII-Komplexe in Detergensumgebung unter Ölimmersion mikroskopiert werden.

Abweichend vom Protokoll aus Kapitel 3.4.1 wurde mit stark verdünnten Lösungen des LHCII bei der Beschichtung gearbeitet. Komplexkonzentrationen von 1 - 5 μM wurden verwendet. Die LHCII-Inkubation auf der HRP-beschichteten Glasplatte erfolgte nur 1 Minute lang und wurde nicht wiederholt.

Um ein schnelles Ausbleichen der Chlorophylle bei der Fluoreszenzmessung zu vermeiden, wurde die in den Experimenten verwendete Flüssigkeitszelle mit 20 μl 1 mg/ml Na-Dithionit in Puffer C gefüllt.

3.5 Einzelmolekulare Fluoreszenzspektroskopie von LHCII-Monomeren und Trimeren

Prinzip

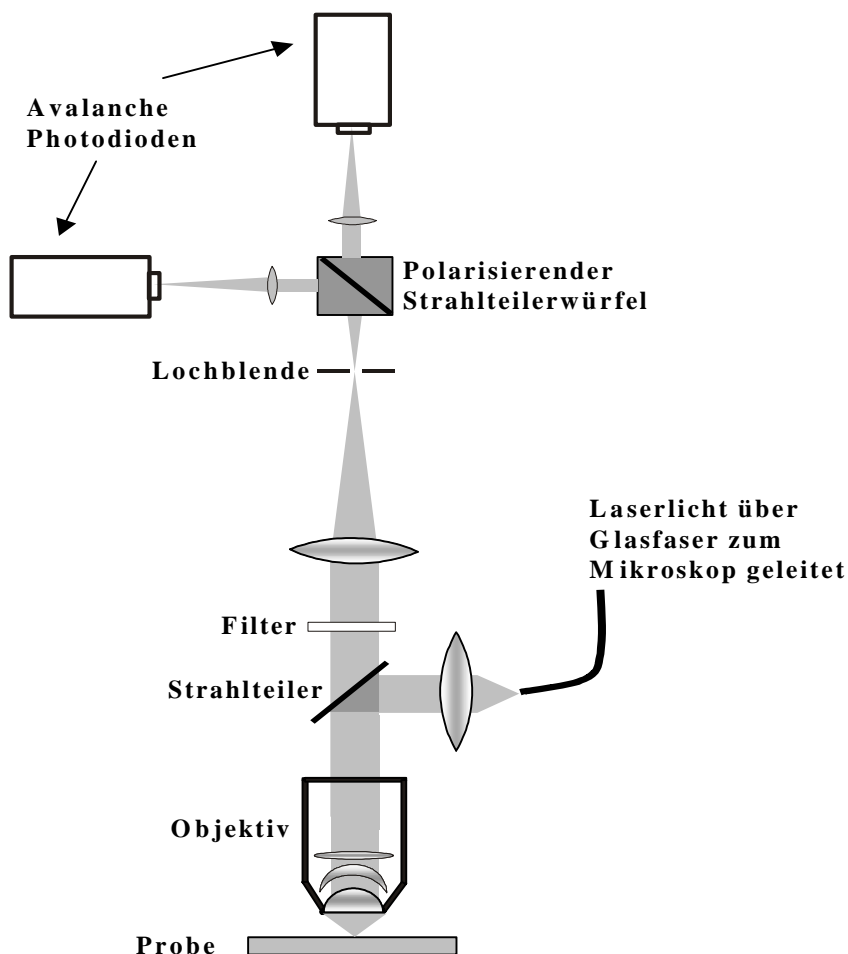
Um die komplexinternen Energietransferprozesse von LHCII besser verstehen zu können, wurden fluorometrische Untersuchungen an singulären Monomeren und Trimeren durchgeführt. Alle einzelmolekülspektroskopischen Untersuchungen wurden von Mitgliedern der AG Wrachtrup des 3. Physikalischen Instituts der Universität Stuttgart durchgeführt, weshalb in dieser Arbeit nur die Grundprinzipien des methodischen Vorgehens dargestellt werden.

In vielen vorangegangenen Experimenten wurde mit LHCII-Komplexen, eingebettet in eine Polyvinylalkohol-Matrix (PVA), gearbeitet. Um eine bessere Orientierung der LHCII-Komplexe in der Messung zu ermöglichen und gleichzeitig in einer wässrigen Umgebung arbeiten zu können, wurden in den Versuchen dieser Arbeit immobilisierte LHCII-Komplexe in Detergensumgebung analysiert.

Methode

LHCII-Monomere und Trimere wurden nach Kapitel 3.4.2 auf Ni-NTA-HRP-beschichteten Deckgläsern immobilisiert und in eine Flüssigkeitszelle eingebracht. Damit lagen die Komplexe zwar fest verankert an einer Oberfläche, jedoch trotzdem in wässriger Umgebung, vor. Die spektroskopischen Untersuchungen fanden unter Ölimmersion an einem Konfokalmikroskop des in Abb. 3.2 dargestellten Aufbaus statt.

Abb. 3.2: Strahlengang im konfokalen Mikroskop zur Detektion der Fluoreszenzpolari- sation einzelner LHCII-Komplexe, Abbildung nach Schuler (2001)



Circular polarisiertes Laserlicht einer Wellenlänge von 650 nm (CW-Farbstofflaser, Coherent 699-21, Santa Clara CA, Linienbreite = 1 MHz, betrieben mit DCM) wurde über eine Glasfaser auf den schwingungsgedämpften Tisch des optischen Aufbaus geführt und über einen Strahlteiler zum Probenobjektiv geleitet. Den Strahlteiler stellte eine einseitig beschichtete Glasplatte dar, an der das Laserlicht zu ca. 10% reflektiert wurde. Nur dieses reflektierte Licht wurde nachfolgend auf die Probe fokussiert.

Das auftretende Fluoreszenzlicht durchlief die selbe Optik und passierte den Strahlteiler zum größten Teil ungehindert. Durch einen holographischen Notchfilter (Kaiser) wurde streuendes Anregungslicht abgetrennt.

Eine Aufspaltung des Fluoreszenzlichts in zwei senkrecht zueinander stehende Polarisationsrichtungen erfolgte durch den polarisierenden Strahlteilerwürfel. Die jeweiligen Lichtanteile wurden durch zwei Avalanche-Photodioden quantifiziert. Die Detektionseffizienz des Systems lag bei 10%.

In den Versuchen wurden zum einen einzelne LHCII-Komplexe über einen Zeitraum von Sekunden - Minuten fluorometrisch charakterisiert (Aufnahme sog. Zeitspuren). Zum anderen wurden Momentaufnahmen des Fluoreszenzverhaltens einiger LHCII-Moleküle durchgeführt.

3.5.1 Momentaufnahme der LHCII-Fluoreszenz

Eine Fläche von maximal $100 \times 100 \mu\text{m}$ wurde mit Laserlicht der Wellenlänge 650 nm Punkt für Punkt rasterförmig abgefahren. Dabei wurde Licht einer Energie von $1 \mu\text{W}$ 4 ms pro Pixel eingestrahlt. Bedingt durch den konfokalen Aufbau betrug die maximale Bildauflösung im Durchmesser 300 nm (in x,y-Richtung, Auflösung in z-Richtung $1 \mu\text{m}$), einzelne LHCII-Moleküle konnten daher nur detektiert werden, wenn die Proben so verdünnt vorlagen, daß der mittlere Komplexabstand größer war als die Ausdehnung des Fokus. Aggregationen mehrerer LHCII-Komplexe zu Superkomplexen konnten dennoch detektiert werden. Große Komplexaggregate wiesen eine stark erhöhte Fluoreszenz auf. Während einzelne LHCII-Monomere Emissionen von ca. 2000-4000 „counts per second“ zeigten, überstieg die Emission der Aggregate diese Emission um ein vielfaches (signifikant bei 10-fach höherer Fluoreszenz). Kleinere Aggregationen von LHCII konnten über ein verändertes Bleichverhalten erkannt werden (vgl. Kapitel 5.2.2).

3.5.2 Fluoreszenzveränderungen über die Zeit (Zeitspuren einzelner LHCII-Emissionen)

Durch die Rasterbildaufnahmen des immobilisierten LHCII konnten die Koordinaten einzelner Moleküle bestimmt werden und so der Laserstrahl zur Excitation einzelner Komplexe positioniert werden. Die Detektion der Chlorophyllfluoreszenz erfolgte in zeitlicher Auflösung von 20 ms. Durch die Aufspaltung des Emissionslichts am polarisierenden Strahlteilerwürfel war eine gleichzeitige Detektion der Fluoreszenzanteile zweier orthogonaler Polarisationsrichtungen möglich. Aus diesen beiden Anteilen wurde nachfolgend der minimale Polarisationsgrad berechnet:

$$p = \left| \frac{I_1 - I_2}{\max(I_1, I_2)} \right|$$

I_1 und I_2 repräsentieren die zwei gemessenen Anteile der verschiedenen Polarisationsrichtungen, p entspricht dem Polarisationsgrad. Daß die angegebene Polarisation nur den minimal möglichen Wert beschreibt, ist im Meßaufbau begründet. Es wurden nur zwei orthogonale

Fluoreszenzanteile quantifiziert, d.h. linear polarisiertes Licht, welches aufgrund seiner Polarisationsrichtung (im 45°Winkel zu den beiden Detektoren) von beiden Photodioden gleich stark detektiert wurde, erhielt nach obiger Formel einen Polarisationsgrad von 0, obwohl einer von 1 vorlag. Nur über eine Auswertung vieler LHCII-Proben war damit eine Abschätzung der Polarisation möglich. Eine genaue Bestimmung des Polarisationsgrads für jeden einzelnen Komplex wäre nur bei Ersatz des polarisierenden Strahlteilerwürfels durch einen rotierenden Polarisator möglich.

In gleicher Meßanordnung konnte das Bleichverhalten der LHCII-Monome und Trimere beobachtet werden. Das Ausbleichen der Chlorophylle konnte über eine Fluoreszenzlöschung gezeigt werden.

3.6 Herstellung der zwei neuen Proteinmutanten Glu6 und Lys6

Prinzip

Ziel war es, den LHCII in seiner AS-Sequenz so zu verändern, daß er über ionische Wechselwirkungen an TiO₂ binden kann. Dazu wurden zwei Mutanten, eine mit einer N-terminalen Häufung von negativen Ladungen (Mutante mit 6 Glutamaten = Glu6) und eine mit einer Häufung von positiven Ladungen (Mutante mit 6 Lysin = Lys6) hergestellt.

Ausgangspunkt für die Gewinnung der Lhcb-1-Mutanten war ein Expressionsplasmid der pDS12-Reihe, in das eine Mutante des *cab*-Gens AB 80 inkloniert worden war. Dieses *lhcb-1*-Gen (codierend für die Mutante C79S, Huschenbett, 2001) unterschied sich vom murenen *lhcb-1* nur durch einen Basenaustausch im Codon der 79. Aminosäure, wodurch im Protein Serin statt Cystein exprimiert wurde. Als Folge davon war das Gen frei von für Cystein codierende Codons.

Um im exprimierten Protein beider Mutanten trotzdem ortsspezifische Farbstoffmarkierungen mittels SH-reaktiver Maleimidgruppen durchführen zu können, wurde eine Codierung für ein N-proximales Cystein eingefügt (AS-Sequenz vgl. Kapitel 2.3).

3.6.1 Restriktion

5 µg DNA der Mutante C79S in H₂O
+ 3 µl NEB 1-Puffer (10 × konzentriert)
+ 0,3 µl BSA (10 mg/ml)
+ 0,6 µl Sac I (20 U/µl)
+ 2,5 µl Sph I (5 U/µl)
wurden auf 30 µl mit H₂O aufgefüllt und 3 h bei 37°C inkubiert.

Mit den Restriktionsenzymen Sac I und Sph I wurde im N-terminalen Bereich ein Stück des *lhcb-1* herausgeschnitten, um es folgenden durch ein gekauftes Oligonucleotid zu ersetzen. Dazu wurde der durch die Enzyme linearisierte Vektor von ungeschnittenem Vektor in einer Gelelektrophorese abgetrennt. Eine Unterscheidung von einfach und zweifach geschnittenem Vektor war im Gel nicht möglich.

3.6.2 Agarose-Gelelektrophorese (nach Ausubel *et al.*, 1995)

Es wurde ein Agarosegel der Konzentration von 0,8% (w/v) benutzt. Dazu wurde die Agarose in 1 × TAE-Puffer (s.u.) unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlen auf ca. 50°C 0,5 cm hoch in eine zuvor mit Klebeband an den beiden Enden verschlossene Gelform eingegossen. Ein eingesteckter Kamm ermöglichte in der nachfolgenden Elektrophorese einen definierten Probenauftrag. Nach Abkühlen der Gelmatrix wurde die Gelform in eine horizontale Elektrophoresekammer mit 1 × TAE-Puffer eingesetzt.

TAE-Puffer (pH 8,0)

40 mM Tris-Acetat

2 mM EDTA

Der TAE-Puffer wurde als 50-fache Stammlösung angesetzt:

242 g Tris

+ 37,2 g Na₂EDTA

+ 850 ml H₂O

wurden gemischt und mit 57,1 ml konzentrierte Essigsäure versetzt. Nach Auffüllen auf 1 Liter Endvolumen war die Stammlösung fertig.

Gellauf

Der komplette Restriktionsansatz wurde mit 1/10 Volumenteil Probenpuffer gemischt (s.u.), auf das Gel aufgetragen (in 3 cm breite Auftragstaschen) und eine einstündige Elektrophorese bei 90 - 100 V durchgeführt. Als DNA-Größenstandards dienten ein 1 kb-marker (Gibco-BRL, Life-Technologies, Eggenstein) und ein 100 bp-marker (New England Biolab (NEB), Schwalbach).

DNA-Fragmente:

	Anzahl der Basenpaare
100 bp-Marker	1.500, 1.200, 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100
1 kb-Marker	10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.000, 1.500, 1.000, 500

Probenpuffer : 20% Ficoll 400, 0,1 M Na₂EDTA/NaOH pH 8,0, 1% SDS und 0,25% Bromphenolblau

Um DNA in möglichst hoher Menge im Anschluß an die Elektrophorese eluieren zu können, wurde nur frischer TAE-Puffer verwendet.

DNA-Färbung

Um die DNA-Fragmente im Gel sichtbar und damit auch eluierbar zu machen, wurde das Agarose-Gel nach Beendigung des Elektrophoreselaufs für 8 - 15 min in ein Ethidiumbromidhaltiges Färbebad (1µg Ethidiumbromid pro ml H₂O) gelegt und anschließend 15 min in einem Wasserbad von überschüssigem Farbstoff befreit.

Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und kann auf dem Transilluminator (Gel Doc 1000, Bio-Rad, München) bei 312 nm zur Fluoreszenzemission im sichtbaren Bereich (Emissionsmaximum 590 nm) angeregt werden. Im Gelelutionsversuch wurde die UV-Lampe nur maximal 10 sec eingeschaltet, um Schädigungen der DNA zu vermeiden. Diese Zeitspanne war ausreichend, um die DNA-haltige Gelmatrix mit einem Skalpellschnitt zu kennzeichnen.

3.6.3 Gelelektion und Quantifizierung

Das DNA haltige Gelstück (aus Kapitel 3.6.2) wurde aus der Gelmatrix ausgeschnitten und anschließend daraus die DNA eluiert. Verwandt wurde ein Gel Extraktions Kit (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Die Gelelektion wurde nach angebenem Standardprotokoll durchgeführt.

Die DNA lag am Ende in wäßriger Lösung vor und mußte vor der Ligation quantifiziert werden. Da die DNA-Menge für eine photometrische Detektion in der Regel nicht ausreichte, wurde eine Quantifizierung gegen bekannte DNA-Mengen im Agarose-Gel durchgeführt. Dazu wurden eine DNA-Probe (20 - 100 ng) und eine definierte Menge des 100 bp-Markers auf ein 1,2% Agarose-Gel aufgetragen. Nach dem Gellauf erfolgte eine DNA-Dokumentation über die Gel Doc mit Hilfe des Programms „Molecular Analyst“ (Bio-Rad, München) (vgl. Wolf, 1998).

3.6.4 Ligation

- 100 ng der zweifach geschnittenen DNA der Mutante C79S
 - + 2 - 10 facher molarer Überschuß des zu doppelsträngiger DNA gepaarten Oligonucleotids (Annealingreaktion s.u.) wurden auf 8 µl mit H₂O aufgefüllt, 5 min bei 43°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt.
 - + 1 µl T4 DNA-Ligase (von NEB, 400U/µl)
 - + 1 µl Ligationspuffer (10 × NEBuffer for T4 DNA, enthält Ligase und 10 mM ATP)
- Der Ligationsansatz reagierte 3 h bei 16°C.

Annealing der gekauften einzelsträngigen Oligonucleotide

Die Oligonucleotide zur Herstellung der Mutanten Glu6 und Lys6 wurden von MWG-Biotech AG, Ebersberg als DNA-Pellets bezogen (Sequenz s. Kapitel 3.6.8) und mit 10 mM Tris, pH 7,5 auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt.

Annealing:

- 1 µl des Sense-Strangs
- + 1 µl des Antisense-Strangs
- + 2 µl 5 × Annealing-Puffer (190 mM Tris pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 250 mM NaCl)
- + 6 µl H₂O

wurden in ein 100°C heißes Wasserbad gegeben und in ca. 3 h auf 30°C abgekühlt.

3.6.5 Transformation

25 ng der ligierten DNA wurde mit 50 µl kompetenten JM101-Zellen (bei -70°C gelagert und 5 min vor Versuchsbeginn auf Eis aufgetaut) durch leichtes Schütteln des Reaktionsgefäßes gemischt und 30 min bei 0°C inkubiert (zur Herstellung kompetenter Zellen vgl. Wiener, 2000). Nach einer anschließenden 5 minütigen Inkubation bei 22°C wurde die Bakterienprobe mit 225 µl 37°C warmem LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C wachsen gelassen. 100 µl der Lösung wurde auf einer LB-Amp-Platte (100 µg Ampicillin/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Wenn die transformierten Bakterien den ligierten Vektor trugen, kam es zum Wachstum von Bakterienklonen durch die auf dem Vektor codierte Ampicillinresistenz.

3.6.6 Midi-prep

Die Plasmidisolierung aus den transformierten Zellen erfolgte mit dem Nucleobond AX 100-System (Macherey-Nagel GmbH&Co.KG, Düren) nach der beiliegenden Vorschrift zur Plasmidaufreinigung.

3.6.7 Überprüfung des korrekten Oligonucleotid-einbaus

Die inserierte Oligonucleotidsequenz beider Mutanten trug eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Nae I. Da die übrige *lhcB*-1- und Vektor-DNA keine solche Schnittstelle besaß, wurde die Linearisierbarkeit des Vektors mit Nae I zum Nachweis der erfolgreichen DNA-Insertion.

1 µg DNA
+ 1,5 µl NEB 1-Puffer (10 ×)
+ 0,5 µl Nae I (10 U/µl)
wurden auf 15 µl mit H₂O aufgefüllt und mindestens 5 h bei 37°C inkubiert (NaeI stellte sich als ein sehr reaktionsträges Restriktionsenzym dar). Als Kontrolle diente DNA der Mutante C79S.

3.6.8 Sequenzierung

Sequenzier-PCR

500 ng DNA
+ 1 µl des forward Primers pDS12 der Sequenz 5' ATT TGC TTT GTG AGC 3' (10 pmol) (Firma MWG-Biotech GmbH, Ebersberg)
+ 4 µl des Perkin-Elmer-Premix (GENterprise®Universität Mainz)
wurden auf 20 µl mit H₂O aufgefüllt und durch eine Sequenzier-PCR amplifiziert.
Sequenzierprogramm: 25 Zyklen à 15 sec 96°C und 4 min 50°C

Ethanolische Fällung des Sequenzieransatzes

20 µl DNA der obigen PCR
+ 50 µl Ethanol
+ 3 µl Na-Acetat, pH 5,0
wurden 5 min bei -80°C inkubiert und anschließend 30 min bei 4°C und 16.000×g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und noch einmal 10 min unter obigen Bedingungen zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in der Speed vac 10 min unter Zuschaltung der Heizung getrocknet.

Sequenzierung

Das Sequenziergel sowie die Bestimmung der Basensequenz aus dem Gel erfolgte durch die Firma GENterprise® (Universität Mainz).

Sequenz der inserierten Oligonucleotide im Vergleich mit der Basensequenz des *lhcb-1* Wildtyps

Die Basensequenz startet mit der Restriktionsstelle Sph I, die gleichzeitig den Beginn der *lhcb-1*-Codierungssequenz darstellt. Die Sequenz endet mit der Sac I-Schnittstelle. Im exprimierten Lhcb-1 wird durch *E.coli* dem Start-Arginin ein Methionin vorangesetzt.

<i>Lhcb-1</i> 5' → 3'	CGT	AAA	TCT	GCT	ACC	ACC	AAG	AAA	GTA	GCG	AGC	T							
	Arg	Lys	Ser	Ala	Thr	Thr	Lys	Lys	Val	Ala	Ser								
<i>Lys6</i> 5' → 3'	CGT	AAG	AAA	AAG	AAA	AAG	AAA	TCT	GCT	ACC	ACC	GCC	GGC	TGC	GCG	AGC	T		
	Arg	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Ser	Ala	Thr	Thr	Ala	Gly	Cys	Ala	Ser			
<i>Glu6</i> 5' → 3'	CGT	GAG	GAA	GAG	GAA	GAG	GAA	AGC	TCT	GCT	ACC	ACC	GCC	GGC	TGC	GCG	AGC	T	
	Arg	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Ser	Ser	Ala	Thr	Thr	Ala	Gly	Cys	Ala	Ser		

3.7 Herstellung und Quantifizierung von Inclusion bodies

3.7.1 Inclusion body-Präparation

Verschiedene Lhcb-1-Mutanten wurde in *E.coli* überexprimiert und als Inclusion bodies isoliert. Mit Ausnahme der Mutante *Glu6* (vgl. Kapitel 6.1) wurde in allen Fällen das gleiche Isolationsprotokoll verwendet (vgl. Fender, 2001). Am Ende lag das denaturierte Lhcb-1-Protein resuspendiert in 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA und 10 mM -Mercaptoethanol vor.

Um in den Farbstoffmarkierungsversuchen mit genauen Lhcb-1-Konzentrationen arbeiten zu können, wurde die ungefähre Konzentration des Proteins im Tris-Puffer über eine A280-Messung bestimmt (vgl. Kapitel 3.7.2) und anschließend mit in 1% SDS gelöstem Lhcb-1 in einer Wiederholungsmessung präzisiert.

Dazu wurde ein Lhcb-1-Aliquot (1-2 mg) der Tris-Suspension durch eine 2 minütige Zentrifugation (max. Umdrehung in der Tischzentrifuge) pelletiert und zwei mal mit Wasser gewaschen, um Pufferreste zu entfernen. Das Pellet wurde dabei in Wasser unter Zuhilfenahme des Ultraschallbads resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Das möglichst wasserfreie Lhcb-1-Pellet wurde im Anschluß mit 1% SDS auf eine Proteinkonzentration von ca. 10 µg/µl eingestellt und verbleibende Proteinaggregate abzentrifugiert.

3.7.2 A280-Messung

Prinzip

Durch die A280-Messung kann die Konzentration eines Proteins in Lösung über den Gehalt an aromatischen Aminosäuren bestimmt werden. Bei 280 nm besitzen Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan ihr Absorptionsmaximum, wobei letzteres in der Absorptionsstärke dominiert.

Methode

Eine Proteinprobe von mindestens 35 µg (in Trispuffer oder in 1% SDS, vgl. Kapitel 3.7.1) wurde auf 1000 µl mit A280-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 6,8, 2% SDS, 1 mM β-Mercaptoethanol) verdünnt und 2 min gekocht. Eine Referenzprobe wurde exakt gleich behandelt (entscheidend war hier die genaue Einstellung auf den selben SDS-Gehalt, da dieses Detergens auch bei 280 nm absorbiert). Nach langsamem Abkühlen (10-15 min) wurde ein Absorptionsspektrum von 200-350 nm aufgenommen und die Extinktion bei 280 nm gemessen. Für das Lhcb-1-Wildtypprotein galt der molare Extinktionskoeffizient von

$4,85 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Hobe, 1995).

⇒ 0,1 OD = 52,5 µg/ml

Die anderen verwendeten Proteinmutanten besaßen zum Teil einen verringerten Gehalt an aromatischen Aminosäuren durch N-terminale Verkürzung. Ihr Extinktionskoeffizient wurde aus dem oben gemessenen Wert errechnet. Dazu wurde die Tryptophanzahl der Proteine miteinander verglichen.

Bsp:

D7f.3 (Wildtyp-Lhcb-1) besitzt 6 Tryptophane

26l.9 (N-58) besitzt nur 4 Tryptophane

Daher wurde als Näherungswert ein um 1/3 verringerter molare Extinktionskoeffizient errechnet.

Extinktionskoeffizienten verschiedener Lhcb-1-Mutanten

Lhcb-1-Mutante	MG [kDa]	Anzahl der Tryptophane	Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]	Proteinkonzentration bei OD = 0,1
26g.11 (N-61)	18,8	4	$3,23 \times 10^4$	58,2 µg/ml = 0,1 OD
26l.9 (N-58)	19,1	4	$3,23 \times 10^4$	59,1 µg/ml = 0,1 OD
Sca (N-21)	23,1	5	$4,04 \times 10^4$	57,6 µg/ml = 0,1 OD
1h.19 (N-11)	24,3	5	$4,04 \times 10^4$	60,2 µg/ml = 0,1 OD

3.8 Entfernen von SDS aus rekonstituiertem LHCI

Prinzip

Eine Rekonstitution des Lhcb-1 kann über drei Methoden erfolgen. Die Faltung kann durch Frier-Tau-Zyklen, eine schnelle Bildung von OG-SDS-Mischmizellen oder aber durch einen Detergenswechsel induziert werden. Charakteristisch für alle Formen der Rekonstitution ist die Vorlage des ungefalteten Proteins zum Beginn des Experiments in SDS bzw. LDS. Das Detergens wird während der Faltung durch Verdünnung in seiner Konzentration herabgesetzt, oder aber durch einen Kationenaustausch in das Kaliumsalz umgelagert und bei 0°C ausgefällt (Detergenswechselrekonstitution, vgl. Kapitel 3.2.2).

Die SDS-Abreicherung war in keinem Fall vollständig, weshalb ein weiterer Reinigungsschritt mit Hilfe der Hydroxylapatit-(HAP)-Chromatographie etabliert wurde. In diesem chromatographischen Verfahren bindet LHCI über ionische Wechselwirkungen an die Säulenmatrix, während das SDS eluiert. Die Komplexe werden im Anschluß durch Zugabe hoher Konzentrationen NaP von der HAP-Matrix verdrängt.

Methoden

Vorbehandlung der HAP-Matrix

0,5 g Bio-Gel®HTP (Firma Bio-Rad)
+ 3 ml 0,1% LM, 10 mM NaP, pH 7,0 (Puffer A)
wurden gemischt und mindestens 10 min quellen gelassen.

Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und nochmals mit Puffer A überschichtet. Dieser Vorgang wurde noch zwei Mal wiederholt. Kleine Bruchstücke des HAP wurden auf diese Weise entfernt und damit eine spätere Verstopfung der Säule verhindert. Da die HAP-Partikel sehr bruchempfindlich waren, wurde bei allen Versuchsschritten auf eine schonende Behandlung des Materials geachtet (das Material wurde nicht stark gerührt, beim Pipettieren der HAP-Suspension wurde die Pipettenspitze abgeschnitten).

Präparation der HAP-Säulen

Das gequollene und gereinigte HAP wurde in Bio-Rad -„Poly-Prep“- Chromatographiesäulen bis zu einer Höhe von ca. 1 cm eingefüllt und mit dem 2-fachem Säulenvolumen von Puffer A gespült (= 20 ml). Anschließend wurden die Säulen auf 4°C gekühlt.

SDS-Abreicherung

Die Puffer A, B und C waren für die SDS-Abreicherung notwendig:

	NaP, pH 7,0 [mM]	LM [%]
Puffer A	10	0,1
Puffer B	100	0,1
Puffer C	700	0,1

Die Rekonstitutionslösung wurde auf die gekühlten HAP-Säule aufgetragen. Eine Proteinmenge von 100 µg pro Säule wurde nicht überschritten. Um zu gewährleisten, daß der komplette Rekonstitutionsansatz in die Säulenmatrix einlief, wurde die Säule mit 1 ml Puffer A nachgespült. Um im folgenden SDS sowie einiges an freiem Chlorophyll abzutrennen, wurde die Säule mit 20 ml Puffer B gewaschen.

Nach der Detergensabreicherung wurde der LHCII durch Zugabe von Puffer C von der HAP-Säule eluiert. Direkt nach Auftrag des Puffers begann eine distinkte grüne Bande in der Matrix zu migrieren, so daß die LHCII-Komplexe konzentriert in 300-400 µl Puffer die Säule verließen. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur, da die NaP-Konzentration in Puffer C sehr hoch war und bei 4°C das Löslichkeitsprodukt überschritt.

Entsalzen der abgereicherten LHCII-Proben

Direkt nach der LHCII-Elution von HAP wurden die Proben in Eis gestellt. Hier begann innerhalb von 10 min das NaP auszukristallisieren. Nach einstündiger Inkubation wurde das NaP-Pellet abzentrifugiert (5 min bei maximaler Umdrehung und 4°C in der Hettich-Zentrifuge).

Jetzt noch im Überstand verbliebenes NaP wurden über eine Hi-Trap™-Säule (Hi-Trap™Desalting Column, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach der Prinzip der Gel-filtration entfernt. Dazu wurde die Säule mit 10 ml 0,1% LM äquilibriert und anschließend 1 ml der LHCII-Lösung (Eluat mehrerer HAP-Säulen) aufgetragen. Die Elution der Komplexe erfolgte nach ca. 1 ml weiterer Zugabe von 0,1% LM in einem Volumen von ca. 1,5 ml. Das vom LHCII abgereicherte NaP verließ die Hi-Trap-Säule nach weiteren 1,5 ml. Um die Säule für einen neuen Versuch zu äquilibrieren, wurde sie mit 20 ml 0,1% LM gespült.

Aufkonzentrierung der Proben

Der von SDS und NaP gereinigte LHCII wurde über Ultrafiltration aufkonzentriert. Um 1,5 ml der Proteinlösung auf 100 µl aufzukonzentrieren, war eine ca. 1,5 stündige Zentrifugation bei 3000×g (Hettich-Zentrifuge) notwendig. Verwendet wurden Filtron®-Röhrchen mit 30kDa-Gößenausschluß (vgl. Kapitel 3.2.1).

3.9 Dünnschichtchromatographie zum SDS-Nachweis in LHCII-haltigen Proben

Proben von 1 - 20 µl Menge (~ 1 µg Lhcb-1) wurden auf eine Silica-60-Dünnschichtchromatographieplatte (DC, Merck, Darmstadt) aufgetragen und mit dem Laufmittel Chloroform : Ethanol : Essigsäure : H₂O im Verhältnis 85 : 15 : 10 : 3,5 chromatographiert.

LM und OG wurden durch eine Naphtolfärbung (nach Christie, 1982) nachgewiesen. Naphtol kann obige Detergentien über den Zuckeranteil detektieren und verursacht eine bläulich-braune Färbung.

SDS wurde durch ein Ansprühen der Platte mit H₂O nachgewiesen. H₂O kann die Silica-Platten nur in Abwesenheit von Detergens oder Lipid befeuchten. Ein hellweißer, trockener Fleck deutete daher auf eine der genannten Substanzen hin. Als SDS konnte der Fleck durch den Vergleich mit einem reinen SDS-Standard über die identische Migration identifiziert werden. Kein anderes potentiell in der Probe vorhandenes Detergens oder Lipid zeigte einen vergleichbaren R_f-Wert. Eine Dokumentation der Ergebnisse war mit Hilfe dieser Detektionsmethode nicht möglich.

3.10 Herstellung von TiO₂-beschichteten Glasplatten

Prinzip

Das Halbleitermaterial TiO₂ wurde als „P25“ der Degussa AG, Darmstadt mit folgenden Spezifikationen erworben. Es bestand zu 70% aus der Anatas- und zu 30% aus der Rutilform, hatte eine Partikelgröße von 25 nm und eine Oberfläche von 55 m²/g. Die Herstellung der halbleiterbeschichteten Glasplatten erfolgte nach Nazeeruddin *et al.* (1993). Durch die Sinterprozedur bei 450°C wurden Halbleiterbeschichtungen der Anatasstruktur hergestellt.

Methode

- 12 g TiO₂
- + 4 ml H₂O
- + 1 ml Essigsäure

wurde gemörsert bis eine zähe Paste entstand. Auf diese Weise wurden TiO₂-Aggregate aufgebrochen und durch den Zusatz der Säure vor einer Reaggregation geschützt.

Danach wurde 1 ml Triton (10%ige Lösung) untergemischt, um später eine geschmeidige Masse zu erhalten. Zur Erreichung der gewünschten Konsistenz des Halbleitermaterials wurde in 1 ml - Schritten H₂O unter weiterem Rühren (jetzt mit einem Spatel) hinzugegeben bis eine leicht streichfähige, aber noch nicht flüssige Masse entstand. Ungefähr 3 ml H₂O waren dazu nötig. Die Paste wurde drei Mal durch ein feines Sieb (Porengröße ca. 0,3 mm) gepreßt, welches noch verbliebene TiO₂-Aggregate abtrennte.

Vor dem Auftrag des Halbleitermaterials wurde eine Glasplatte am Rand mit Scotch®-Klebeband (50 µm Dicke) abgeklebt, um nachfolgend eine definierte Auftragshöhe zu erreichen. Die Halbleitermasse wurde darauf mit einem Spatel verteilt und mit dem angefeuchteten Spatel auf die Dimension des Klebebandes herunter ausgestrichen. Wurde im Versuch die TiO₂-Konsistenz zu flüssig gewählt, riß beim Trocknen das Halbleitermaterial.

Nach 1 h war das TiO₂ trocken und konnte in einem 30 minütigen Prozeß bei 450°C gesintert werden (Ofennutzung in der speziellen Botanik nach zweistündiger Aufheizphase). Nach dem Sinterprozeß sollte eine Halbleiter-Schichtdicke von ca. 12 µm erreicht worden sein (Nazeeruddin *et al.* 1993).

Von J.Durrant zur Verfügung gestellte Platten hatten eine 8 µm dicke TiO₂-Beschichtung.

Verwendetes Glas

- Um die Immobilisierbarkeit des LHCII auf TiO₂ zu testen, wurde der Halbleiter auf einen Objektträger ausgestrichen, welcher nach dem Sinterprozeß mittels Glasschneider portioniert wurde. Es wurden Stücke einer Größe von 2,5 × 1,1-1,2 cm geschnitten, damit ein direktes Einsetzen der beschichteten Glasplatte in den Küvettenhalter der „Front-face“-Apparatur möglich war.
- Um die Möglichkeit der Elektroneninjektion von LHCII in das Leitungsband von TiO₂ zu testen, wurde ITO-Glas verwendet (Libbey Owens Ford Co, Toledo, Ohio, USA). Dieses Glas wurde auf eine Dimension von 4,5 × 4 cm geschnitten, dann beschichtet und gesintert.

TiO₂-Flächen

- Von J.Durrant zur Verfügung gestellte TiO₂-Platten hatten im Versuch eine Halbleiterfläche von 1,1-1,2 × 1 cm.
- Selbst beschichtete TiO₂-Objektträger hatten eine Halbleiterfläche von 1,1-1,2 × 1,7 cm.
- TiO₂-beschichtetes ITO-Glas hatte eine Halbleiterfläche von ca. 2 × 2 cm.

3.11 Immobilisation von LHCII auf TiO₂-beschichteten Oberflächen

Prinzip

LHCII wurde auf gesinterten TiO₂-Oberflächen für mehrere Tage inkubiert, um eine möglichst hohe Proteinbeladungsdichte zu erreichen. Ziel war es, eine Diffusion der Komplexe in die poröse Oberfläche hinein zu erreichen.

Methode

LHCII wurde über eine HAP-Säule von SDS befreit (vgl. Kapitel 3.8), anschließend mittels einer HiTrap™-Säule entsalzt und durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Eine Abtrennung von ungefaltetem Protein und freiem Chlorophyll erfolgte durch eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation. Die aufgereinigten Komplexe wurden für mindestens 24 h, besser jedoch 48 h auf einer TiO₂-Oberfläche bei 0°C inkubiert. Es wurden LHCII-Mengen von 0,2 - 1 nmol in maximal 500 µl Lösung eingesetzt.

Versuche mit TiO₂-beschichteten Objektträgern

Selbst hergestellte oder von J.Durrant zur Verfügung gestellte beschichtete Objektträger wurden in Kunststoffformen der Maße $2,5 \times 1,2 \times 0,2$ cm gelegt (Material des Kunststoffs: Optosil®Pplus, Heraeus Kulzer, Dormagen) und die LHCII-Lösung darauf verteilt. Die Kunststoffformen wurden in Petrischalen auf Eis inkubiert und mit einer Aluminiumoxidplatte als Kälteleiter abgedeckt.

Versuche mit TiO₂-beschichtetem ITO-Glas

Um die TiO₂-Beschichtung auf der Glasplatte wurde ein Damm aus Knetmaterial (Eberhard Faber, Kinderknete - weiß) gelegt und die LHCII-Lösung hineinpipettiert. Die Glasplatten wurden ebenfalls in einer Petrischale im Eis unter Kälteleitung von Aluminiumoxid gelagert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die LHCII-Lösung abpipettiert und die TiO₂-beschichtete Glasplatte für mindestens eine Stunde in einem Becherglas mit 5 ml 0,1% LM, 0,4 - 0,6 M Saccharose und 5 mM Tricine, pH 7,8 gelagert, um ungebundenes LHCII zu entfernen.

4. Die Erstellung eines biomimetischen Modells aus LHCII und angekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff

4.1 Charakteristika der verwendeten Farbstoffe

In dieser Arbeit wurden vier Fluoreszenzfarbstoffe als potentielle Energieakzeptoren in biomimetischen Modellen getestet. Ziel war es, einen Farbstoff zu finden, der die vom LHCII aufgenommene Lichtenergie nahezu vollständig übernehmen kann und diese nachfolgend in veränderter Qualität (z.B. als Fluoreszenz anderer Wellenlängen als im LHCII) wieder verfügbar macht.

Im folgenden werden die vier verwendeten Farbstoffe mit ihren spektroskopischen Eigenschaften, ihrem Redoxverhalten sowie den errechneten R_0 -Werten (försterkritischer Abstand, bei dem 50% der Anregungsenergie vom Donor auf den Akzeptor übertragen wird) zum Energietransfer von Chl_a auf den Energieakzeptor vorgestellt. Eine allgemeine Einführung in die verwendeten Farbstoffklassen sowie eine strukturelle Darstellung der verwendeten Fluorophore ist in Kapitel 1.3 zu finden.

4.1.1 Spektroskopische Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe

Um die Energietransfereffizienz vom LHCII auf die angekoppelten Farbstoffe, R_0 und daraus folgend den molekularen Abstand zwischen LHCII und Energieakzeptor zu ermitteln, war eine Bestimmung der Farbstoff-Extinktionskoeffizienten und -Quantenausbeuten bei 297K und 77K notwendig.

Die Extinktionskoeffizienten wurden nach Kapitel 3.3.3 bestimmt. Die Überführung der Cyaninfarbstoffe aus dem organischen Lösungsmittel in eine wässrige Detergenumgebung hatte keine Veränderung des Extinktionskoeffizienten zur Folge. Die Verminderung der Temperatur von 297K auf 77K bewirkte dagegen einen starken Anstieg.

Die Auswirkungen der Umgebungsveränderung waren auch für Maleimido-BTI gering, so wurde nach Überführung des Rylensfarbstoffs von Chloroform in SDS eine Verringerung des Extinktionskoeffizienten um ca. 5% detektiert. Tabelle 4.1 vergleicht die gemessenen Werte mit den zur Verfügung gestellten Daten der Farbstoffhersteller.

Die Fluoreszenzquantenausbeuten der Farbstoffe wurden nach Kapitel 3.3.4 in relativen Messungen bestimmt. Referenz zur Bestimmung der Quantenausbeute von Cy5.5 bei 77K war die vom Hersteller angegebene Quantenausbeute bei 297K. Die Tieftemperatur-Quantenausbeute konnte nur mit einem geschätzten Fehler von maximal 10% ermittelt werden. Die Ursache dafür lag in der Inhomogenität der Farbstoffprobe, die in den 77K-Messungen zutage trat (vgl. Kapitel 4.1.2). So konnte nur nach Excitation mit 660 nm eine potentielle Fluoreszenzemission der gesamten Farbstoffquantität angenommen werden. Jede andere Anregungswellenlänge verringerte die Halbwertsbreite der Fluoreszenz. Bei 660 nm wurden daher die Proben auf gleiche Absorption eingestellt. Potentielle Farbstofffluoreszenzen kürzerwellig als 660 nm konnten auf diese Weise nicht in die Quantifizierung mit einbezogen werden und verursachten den großen Meßfehler.

Referenz zur Bestimmung der Quantenausbeute von NIR-Cy bei 297K und 77K war die Fluoreszenzquantenausbeute von IRD38 (vgl. Tabelle 4.1). Auch hier mußte ein großer Fehler in der Messung aus zwei Gründen in Kauf genommen werden. Zum einen war die Quantenausbeute von IRD38 nur in Methanol bekannt, die Quantenausbeute von NIR-Cy mußte aber in einer wäßrigen Detergenzlösung quantifiziert werden, um auf die Gegebenheiten im LHCIIFarbstoff-Konstrukt übertragbar zu sein. Der Vergleich beider Fluoreszenzen erfolgte damit in unterschiedlichen Medien, was besonders durch die unterschiedliche Lichtbrechung zu Quantifizierungsfehlern führte. Zum zweiten war die NIR-Cy-Fluoreszenz zu langwellig, um vollständig mit dem zur Verfügung stehenden Fluorometer detektierbar zu sein. Ein Teil des Spektrums konnte nur interpoliert werden. Die Absorption beider Farbstoffe wurde bei 776 nm auf gleiche Werte eingestellt und diese Wellenlänge nachfolgend auch zur Excitation verwendet.

Die Fluoreszenzquantenausbeute von Maleimido-BTI wurde bei 297K in THF und in wäßriger Umgebung, an Lhcb-1 gekoppelt, ermittelt. Es wurde eine relative Messung gegen Rhodamin 700 durchgeführt. Die Quantenausbeute von Rhodamin 700 war in einer absoluten Messung von C.Zander (pers. Mitteilung, Physikalische Chemie, Universität Siegen) mit $0,363 \pm 0,01$ (in 80% Ethanol und 20% Trifluoressigsäure) bestimmt worden. Beide Farbstoffe wurden auf gleiche Absorptionsmaxima bei 655 nm eingestellt und bei dieser Wellenlänge auch angeregt. Quantifizierungsungenauigkeiten auf dem Niveau von 5% (in THF) bzw. 10% (in Detergens) wurden durch die Wahl unterschiedlicher Lösungsmittel und die geringe Detektorsensitivität im NIR-Bereich erreicht.

Tabelle 4.1: Zusammenstellung der spektroskopischen Daten zu den vier verwendeten Farbstoffen

	Molekulargewicht	Extinktionskoeffizient (im Absorptionsmaximum) [M ⁻¹ ·cm ⁻¹]	Absorptionsmaximum, 297 K [nm]	Emissions-Maximum 297 K [nm]	Quantenausbeute
Cy5.5	1128,41	297K: 250.000 [MeOH, Detergens] 77K: 416.000 ⁴	678 ¹	695 ¹	297K: 0,28 ² 77K: 0,58 ³
NIR-Cy	880,14	297K: 198.000 [MeOH, Detergens] 77K: 270.000 ⁷	809 ⁵	835 ⁵	297K: 0,19 ⁶ 77K: 0,57 ⁶
IRD38	1067	297K: 180.000 [MeOH]	776 ⁹	797 ⁹	297K: 0,345 ⁸ [MeOH]
Maleimido-BTI	1288,57	297K: 90.000 [Chloroform] 85.000 ¹⁰ [Detergens]	701 ¹¹	735 ¹¹	297K: 0,03 ¹² [Detergens] 0,10 ¹³ [THF]

¹ an Lhcb-1-Cy5.5 gemessen (in 0,1% SDS, 50 mM Tris, 384 mM Glycin und 1 mM EDTA)

² vom Hersteller für an Protein gekoppelten Farbstoff angegeben

³ relative Messung in 0,025% LM, 1,25 mM Tricine, pH 7,8, 0,15 M Saccharose und 60% Glycerin ($\pm 10\%$) gegen Cy5.5 in 0,1% LM, 5 mM Tricine pH 7,8, 6 M Saccharose bei 297K. Beide Proben wurden bei 660 nm auf gleiche Absorption eingestellt und fluorometrisch angeregt.

⁴ in 0,025% LM, 1,25 mM Tricine, pH 7,8, 0,15 M Saccharose und 60% Glycerin gemessen ($\pm 2,1\%$)

⁵ in 0,1%LM, 5 mM Tricine, pH 7,8 und 0,6 M Saccharose

⁶ relative Messung bei 297K in 0,1%LM, 5 mM Tricine, pH 7,8 und 0,6 M Saccharose und bei 77K in 0,025% LM, 1,25 mM Tricine, pH 7,8, 0,15 M Saccharose und 60% Glycerin gegen IRD38 in Methanol. Der Fehler ist nicht bestimmbar, wurde aber auf ca. 20% geschätzt. Beide Proben wurden bei 776 nm auf gleiche Absorption eingestellt und fluorimetrisch angeregt.

⁷ in 0,025% LM, 1,25 mM Tricine, pH 7,8, 0,15 M Saccharose und 60% Glycerin ($\pm 2,1\%$)

⁸ Herstellerangabe

⁹ an Lhcb-1-IRD38 gemessen (in 0,1% SDS, 50 mM Tris, 384 mM Glycin und 1 mM EDTA)

¹⁰ bestimmt an Lhcb-1-BTI (in 0,1% SDS, 50 mM Tris, 384 mM Glycin und 1 mM EDTA) über die Proteinkonzentration (1 mol Maleimido-BTI pro mol Lhcb-1, Fehler $\pm 10\%$). Dazu wurde die Proteinmenge in einem SDS-Polyacrylamid-Gel densitometrisch bestimmt (vgl. Wolf, 1998).

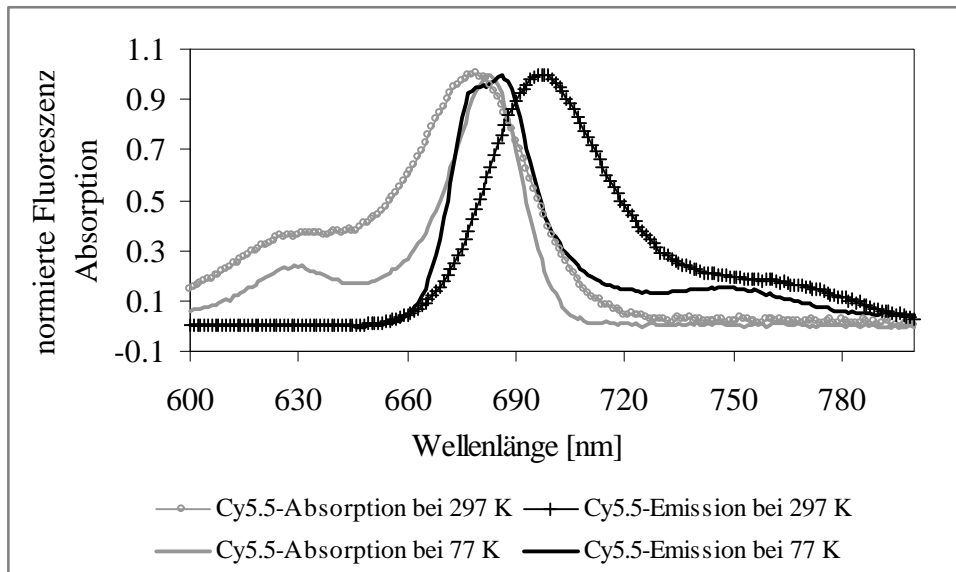
¹¹ an Lhcb-1-BTI gemessen, in 0,1% SDS, 50 mM Tris, 384 mM Glycin und 1 mM EDTA

¹² relative Messung an Lhcb-1-BTI in 0,1% SDS, 50 mM Tris, 384 mM Glycin und 1 mM EDTA ($\pm 10\%$) gegen Rhodamin 700 in 80% Ethanol und 20% Trifluoressigsäure ($f = 3,363 \pm 0,01$). Beide Proben wurden bei 655 nm auf gleiche Absorption eingestellt und anschließend fluorometrisch angeregt.

¹³ relative Messung ($\pm 5\%$), Meßverfahren wie in ¹²

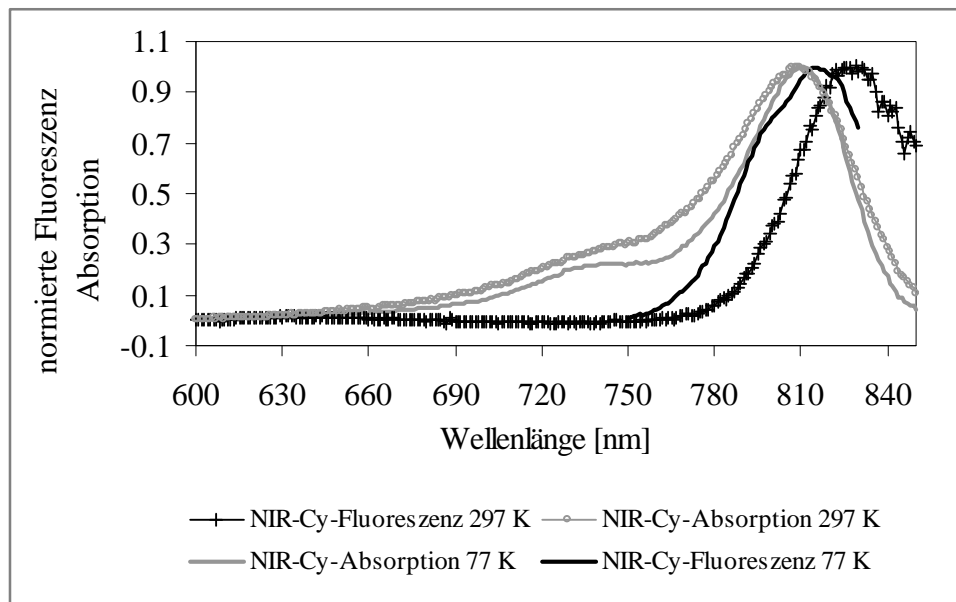
Um mit Hilfe der ermittelten Extinktionskoeffizienten und Quantenausbeuten den fürsterkritischen Abstand R_0 zwischen Chla und dem betreffenden Farbstoff zu ermitteln, mußten auch die Spektrenverläufe der Farbstoffabsorption und -emission bei 297K und 77K bestimmt werden.

Abb. 4.1 Absorption und Emission von Cy5.5 bei 297K und 77K



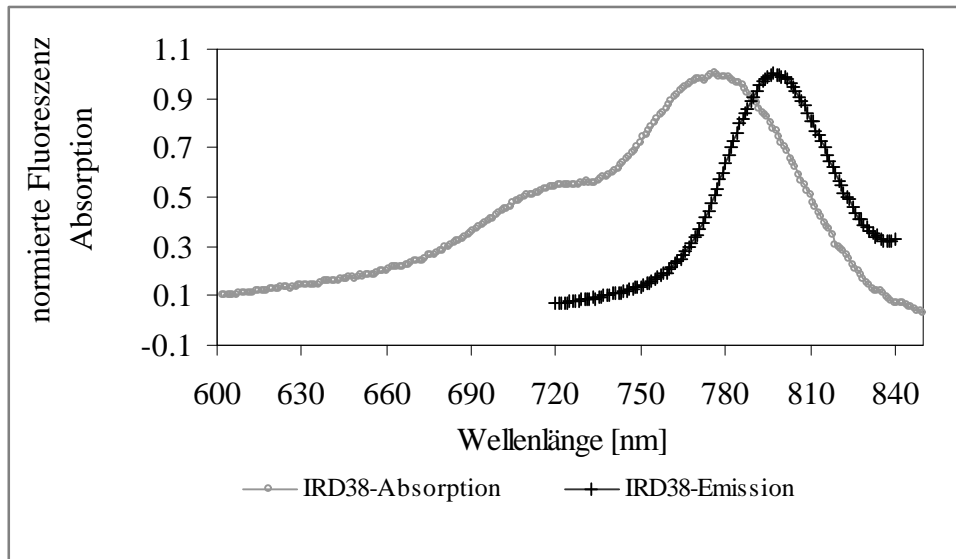
Die Cy5.5-Absorption und -Emission bei 297K wurde an Lhcb-1-Cy5.5 in 0,1% SDS, 50 mM Tris, 384 mM Glycin und 1 mM EDTA gemessen. Die 77K - Meßdaten stammen von freiem Cy5.5 in 0,025% LM, 1,25 mM Tricine, pH 7,8, 0,15 M Saccharose und 60% Glycerin (der Kurvenverlauf ändert sich nicht durch Kopplung an das Protein).

Abb. 4.2 Absorption und Emission von NIR-Cy bei 297K und 77K



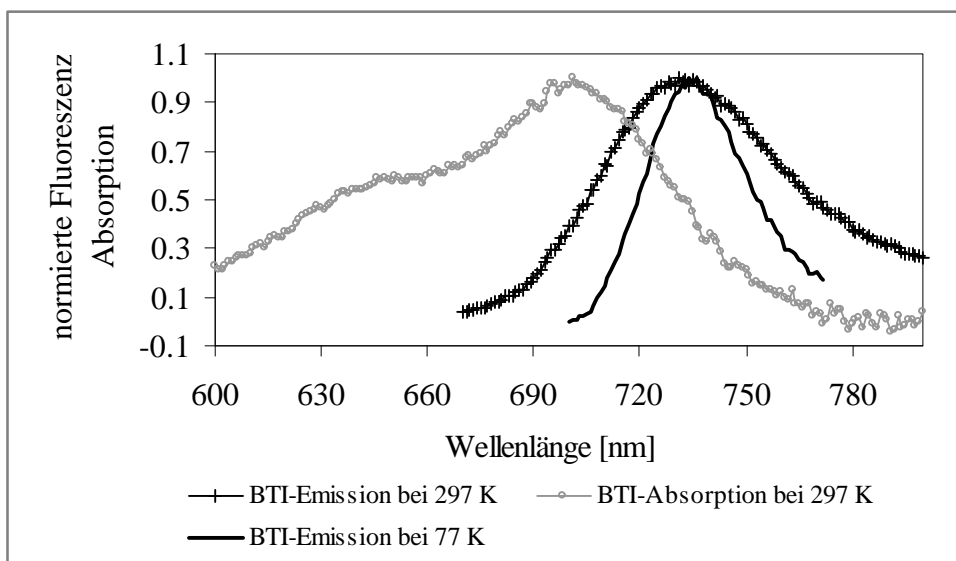
Die NIR-Cy-Absorption und -Emission wurde bei 297K in 0,1%LM, 5 mM Tricine, pH 7,8 und 0,6 M Saccharose und bei 77 K in 0,025% LM, 1,25 mM Tricine, pH 7,8, 0,15 M Saccharose und 60% Glycerin bestimmt.

Abb. 4.3 Absorption und Emission von IRD38 bei 297K



Die Absorption und Emission von IRD38 wurde in 0,1% SDS, 50 mM Tris, 384 mM Glycin und 1 mM EDTA gemessen. Der Farbstoff lag hierbei teilweise frei und teilweise an Lhcb-1 gekoppelt vor.

Abb. 4.4 Absorption und Emission von Maleimido-BTI bei 297K und 77K



Die Maleimido-BTI-Absorption und -Emission bei 297K wurde an Lhcb-1-BTI in 0,1% SDS, 50 mM Tris, 384 mM Glycin und 1 mM EDTA gemessen. Die Maleimido-BTI-Fluoreszenz bei 77K wurde aus dem LHCII-BTI-Emission nach Anregung von Chla bestimmt (in 0,025% LM, 1,25 mM Tricine, pH 7,8, 0,15 M Saccharose und 60% Glycerin).

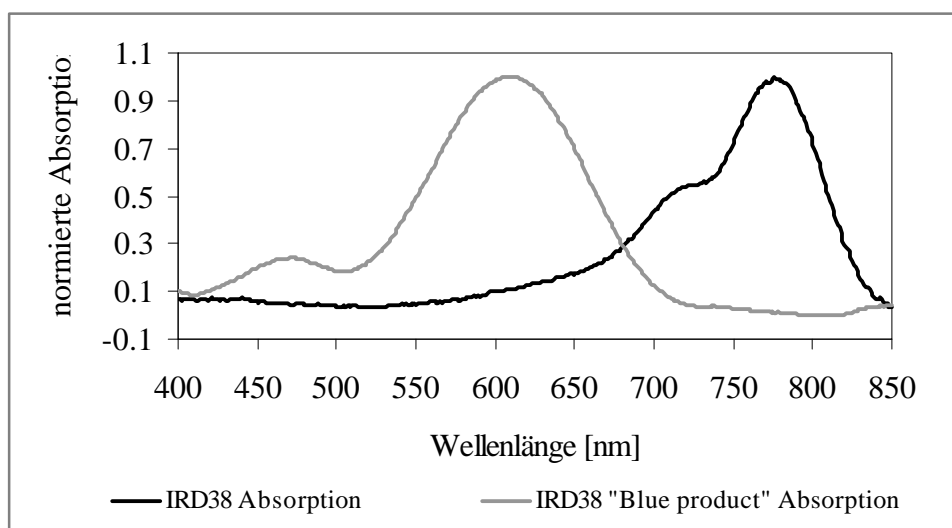
Bei allen Farbstoffen trat zusätzlich zur Hauptabsorption noch eine sehr geringe Absorption im Bereich von 400 – 450 nm auf, die jedoch keinen Einfluß auf die Berechnung der Energietransfereffizienz von LHCII auf den jeweiligen Energieakzeptor hatte (der Extinktionskoeffizient von Cy5.5 beträgt beispielsweise 1,2% der Chlorophyllextinktion bei 410 nm in LHCII-Cy5.5-Konstrukten).

4.1.2 Spektroskopische Besonderheiten der verwendeten Farbstoffe

IRD38

IRD38 wird bei Anwesenheit von primären Aminogruppen und/oder hohem pH-Wert umgelagert zum sog. „Blue product“ (pers. Mitteilung von Dr. Nara Narayanan, Firma LI-COR). Induziert werden konnte diese Umlagerung im Versuch durch eine IRD38-Inkubation in 5 mM NaOH für mindestens 15 min. Aber auch eine 12 stündige Aufbewahrung im Elektrophoresepuffer des präparativen Gelelektrophoresesystems induzierte diese Degradation. Trotz optimiertem Umfunktionalisationsrezept (vgl. Kapitel 3.1.2.2) kam es auch gelegentlich bei der Umwandlung der NCS-Gruppe in eine Maleimidgruppe zu einer spontanen Bildung des „Blue products“.

Abb. 4.5: Absorption von IRD38 vor und nach Umlagerung zum „Blue product“



IRD38 wurde in 0,1% SDS, 50 mM Tris, 384 mM Glycin, 1 mM EDTA und 5 mM NaOH 15-30 min bei 37°C inkubiert. Die Absorptionsspektren zeigen das „Blue product“ in sowie den intakten IRD38 gekoppelt an Lhcb-1 in 0,1%SDS, 1%OG und 20 mM NaP, pH 7,0.

Cy5.5/NIR-Cy

Beide Cyaninfarbstoffe zeigten in 77K-Fluoreszenzmessungen Inhomogenitäten. Die Halbwertsbreite der Fluoreszenz sowie das eigentliche Fluoreszenzmaximum variierten je nach Anregungswellenlänge, so daß von unterschiedlichen Substanzen (Isomere oder Farbstoffabbauprodukte) in der Meßlösung ausgegangen werden mußte (zur graphischen Darstellung bei Cy5.5 vgl. Stöcklin, 2000).

Bei Cy5.5 trat die größte Halbwertsbreite der Fluoreszenz nach Anregung bei 660 nm auf. Diese Fluoreszenz konnte in zwei Spektren dekonvolviert werden, die den gemessenen Emissionsspektren einer Anregung von 630 und 650 nm entsprachen. Damit waren zumindest zwei Subpopulationen der Cy5.5-Fluoreszenz wahrscheinlich. Da auch die Emissionsspektren einer Anregung bei 630 bzw. 650 nm keiner idealisierten Gauß- oder Lorentzfunktion entsprachen, können weitere Unterpopulationen nicht ausgeschlossen werden.

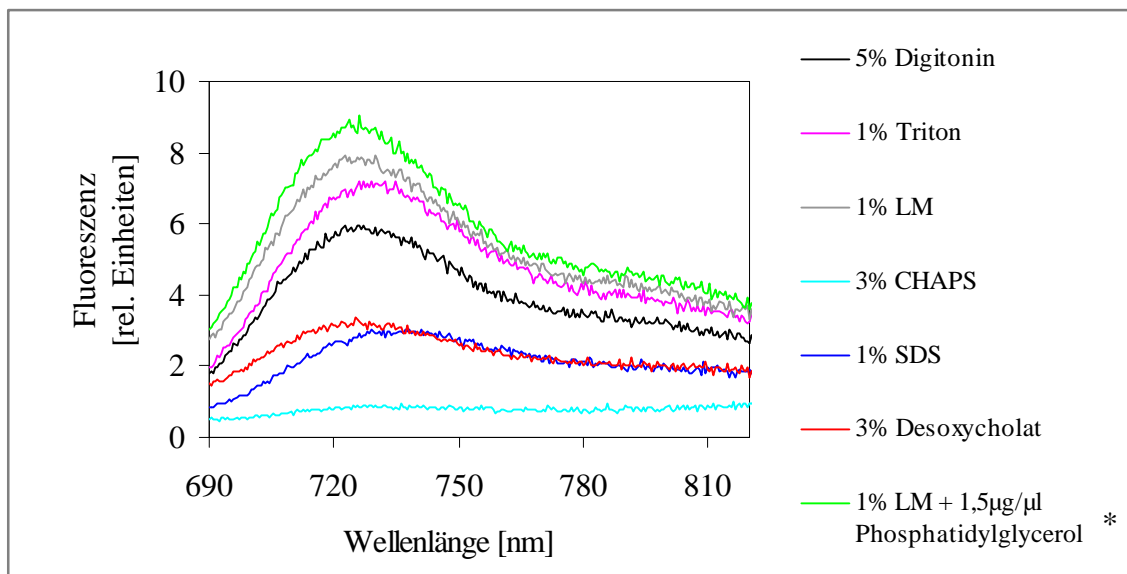
Maleimido-BTI

Die Fluoreszenzquantenausbeute von Maleimido-BTI wurde in THF mit 0,1 bestimmt und sank um 70% auf 0,03 in wäßriger Umgebung (vgl. Tabelle 4.1). Um in dieser Umgebung die Quantenausbeute zu steigern, wurden verschiedene Detergentien und Lipide zugesetzt. Ziel

war es, Bedingungen zu finden, unter denen in einem späteren biomimetischen Modell aus LHCII und Maleimido-BTI nach Energietransfer vom Chla auf den Farbstoff die Energie in möglichst großem Umfang wieder als Fluoreszenz sichtbar wird.

Verwendet wurde im Versuch Lhcb-1-BTI einer Markierungsreaktion nach Proteinfällung ohne weitere Aufreinigungsschritte, d.h. unmarkiertes Protein lag mit in Lösung vor. Nicht gebundener Farbstoff wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Maleimido-BTI ist nur an Lhcb-1 gebunden detergenschlüssig, freier Farbstoff aggregiert wie stark veränderte Absorptions- und Emissionsspektren belegten (Absorptionsmaximum bei ~650 nm, nicht dargestellt). Getestet wurden LM, SDS, CHAPS, Digitonin, Desoxycholat, Triton und das Lipid Phosphatidylglycerol.

Abb. 4.6: Veränderung der Fluoreszenzquantenausbeute von Maleimido-BTI durch Variation der Detergenumgebung



Ein Gemisch aus Lhcb-1 und Lhcb-1-BTI wurde in unterschiedlichen wässrigen Medien fluorometrisch charakterisiert. Die Proben wurden dazu auf gleichen Farbstoffgehalt (< 0,1 OD) normiert (eine Ausnahme bildet hier die mit * gekennzeichnete Probe, sie enthielt nur die 0,71-fache Maleimido-BTI-Konzentration) und bei 680 nm angeregt.

Wie Abb. 4.6 zeigt, konnte die Maleimido-BTI-Fluoreszenz durch die Variation der Umgebung stark verändert werden. Es stellte sich heraus, daß die Fluoreszenz mit Zunahme der Aggregationszahl des eingesetzten Detergens (Anzahl der Detergensmoleküle pro Mizelle, vgl. Tabelle 4.2) anstieg. Ein Zusatz des Lipids Phosphatidylglycerol zur Lhcb-BTI-Lösung in 1% LM führte zu einer weiteren Emissionssteigerung.

Tabelle 4.2: Aggregationszahlen der eingesetzten Detergentien

Detergens	Aggregationszahl
CHAPS	4-14
Digitonin	60
SDS	62
LM	98
Triton	100-155
Desoxycholat	3-12

Aggregationszahlen aus Calbiochem® Biochemicals entnommen

4.1.3 Försterkritischer Abstand R_0

Aus den in Tabelle 4.1 und Abb. 4.1 - 4.4 dargestellten Daten wurde der försterkritische Abstand R_0 für den Übergang von Chla auf den Farbstoff sowie für den Übergang vom Farbstoff auf Chla berechnet. R_0 stellt den Abstand zwischen einem Donor- und einem Akzeptormolekül dar, bei dem eine Energietransfereffizienz von 50% detektierbar wird. Die Berechnung von R_0 erfolgt nach Latt *et al.* (1965).

Abb. 4.7: Formel zur Bestimmung von R_0 (nach Latt *et al.*, 1965)

$$R_0 = 9,79 \times 10^3 (f_{\text{Donor}} \times \kappa^2 \times n^{-4} \times J_{\text{DA}})^{1/6} [\text{\AA}]$$

$$J_{\text{DA}} = \int f_{\text{D}}(\lambda) \times \epsilon_{\text{A}}(\lambda) \times \lambda^4 d\lambda / \int f_{\text{D}}(\lambda) d\lambda [\text{cm}^3/\text{M}]$$

$f_{\text{D}}(\lambda)$ = normierte Fluoreszenz vom Donor (D), $\int f_{\text{D}}(\lambda) = 1$

$\epsilon_{\text{A}}(\lambda)$ = Extinktionskoeffizientenkurve vom Akzeptor (A)

J_{DA} = Überlappungsintegral zwischen der normierten Donorfluoreszenz und der Extinktionskoeffizientenkurve von A, bei Einsetzen von J_{DA} der Einheit $[\text{cm}^3/\text{M}]$ in obige R_0 -Gleichung, erhält man R_0 in der Einheit $[\text{\AA}]$.

κ^2 = geometrischer Faktor, der Auskunft gibt über die Orientierung der Dipolmomente von D und A. Da κ^2 in den Donor-Akzeptor-Konstrukten dieser Arbeit nicht bekannt war, wurden mögliche R_0 -Werte für $\kappa^2 = 2/3$ und $\kappa^2 = 4$ berechnet (vgl. Kapitel 7.1.2)

n = Brechungsindex, hier wurde der von Wasser verwendet = 1,33

f und ϵ sind für die Farbstoffe in Tabelle 4.1 angegeben, für Chla in LHCII gelten folgende Daten:

$f_{297\text{K}}$ = 0,154, gegen Chla in Ethanol nach einer Anregung bei 410 nm gemessen (f_{Chla} in Ethanol = 0,22, Seely and Conolly, 1986). Beide Proben wurden bei 410 nm auf gleiche Absorption eingestellt.

$f_{77\text{K}}$ = $0,39 \pm 0,03$, relative Messung in 0,025% LM, 1,25 mM Tricine, pH 7,8, 0,14 M Saccharose und 60% Glycerin gegen LHCII bei 297K in 0,1% LM, 5 mM Tricine, pH 7,8 und 0,57 M Saccharose, es wurde auf 410 nm normiert und bei der selben Wellenlänge angeregt.

$\epsilon_{297\text{K}} 670 \text{ nm} = 546.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Butler und Kühlbrandt, 1988)

$\epsilon_{77\text{K}} 674,5 \text{ nm} = 766.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \pm 11.500$ (in 0,025% LM, 1,25 mM Tricine, pH 7,8, 0,14 M Saccharose und 60% Glycerin bestimmt)

Mit Hilfe der Formel aus Abb. 4.7 wurden mögliche R_0 -Werte für die Donor-Akzeptor-Paare „Chla – Maleimido-BTI“, „Chla – Cy5.5“ und „Chla – NIR-Cy“ bestimmt. Da κ^2 in keinem Fall determiniert werden konnte, sind in Tabelle 4.3 R_0 mit $\kappa^2=2/3$ und $\kappa^2=4$ bestimmt worden (vgl. Kapitel 7.1.2).

Tabelle 4.3: R_0 -Werte verschiedener Donor-Akzeptor-Paare der biomimetischen Modelle

		R_0 [Å] Chla → Farbstoff für $\kappa^2 = 4$ (für $\kappa^2 = 2/3$)	R_0 [Å] Farbstoff → Chla für $\kappa^2 = 4$ (für $\kappa^2 = 2/3$)
Cy5.5	297 K	92(68)	93 (69)
	77 K	114 ¹ (85 ¹)	117 ² (87 ²)
Maleimido-BTI	297 K	78 ³ (58) ³	46 ⁴ (34 ⁴)
NIR-Cy	297 K	70 (52)	0 ⁵
	77 K	80 ⁶ (59 ⁶)	0

¹ $R_0 \pm 1\%$, verursacht durch den Fehler bei der Bestimmung der Quantenausbeute

² $R_0 \pm 3\%$, verursacht durch den Fehler bei der Bestimmung der Quantenausbeute

³ $R_0 \pm 2\%$, verursacht durch den Fehler bei der Bestimmung des Akzeptor-Extinktionskoeffizienten

⁴ $R_0 \pm 3\%$, verursacht durch den Fehler bei der Bestimmung der Quantenausbeute

⁵ R_0 rechnerisch nicht mit Null bestimmt, da auch minimale Schwankungen in der Fluoreszenz- und Absorptionsbasislinie durch die Multiplikation mit (nm^4) zu positiven R_0 -Werten führen können.

⁶ $R_0 \pm 1\%$, verursacht durch den Fehler bei der Bestimmung der Quantenausbeute.

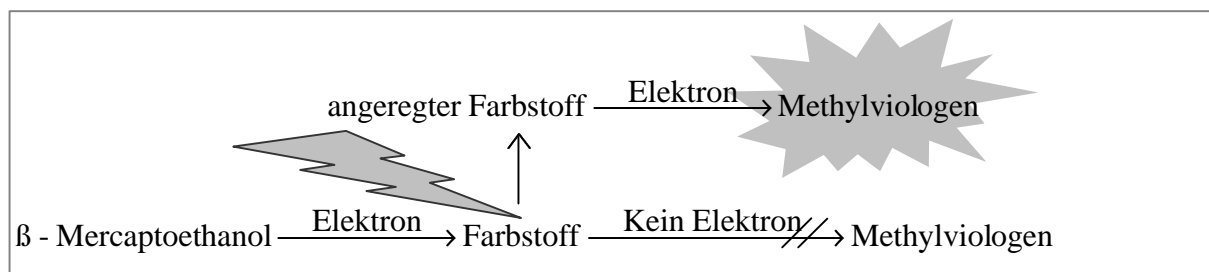
4.1.4 Redoxverhalten von Maleimido-BTI und Cy5.5

Cy5.5 und Maleimido-BTI wurden auf ihr Redoxverhalten hin überprüft. Ziel war es, herauszufinden, ob die beiden genannten Farbstoffe Elektronentransfereigenschaften besitzen, was sie für Versuche zur Elektroneninjektion in das Leitungsband eines Halbleiters interessant machen würde (vgl. Kapitel 1.4.2). Die Eigenschaft als Elektronendonator zu dienen, wurde mit Hilfe von Methylviologen (MV) als potentielltem Akzeptor getestet.

Wird MV reduziert, kann dies photometrisch durch einen Farbumschlag der Meßlösung nachgewiesen werden. Reduziertes MV besitzt eine maximale Absorption bei 616 nm.

Für beide Farbstoffe wurde der Versuch nach dem in Abb. 4.8 dargestellten Prinzip aufgebaut.

Abb. 4.8: Nachweis des Elektronenübergangs von einem Farbstoff auf MV



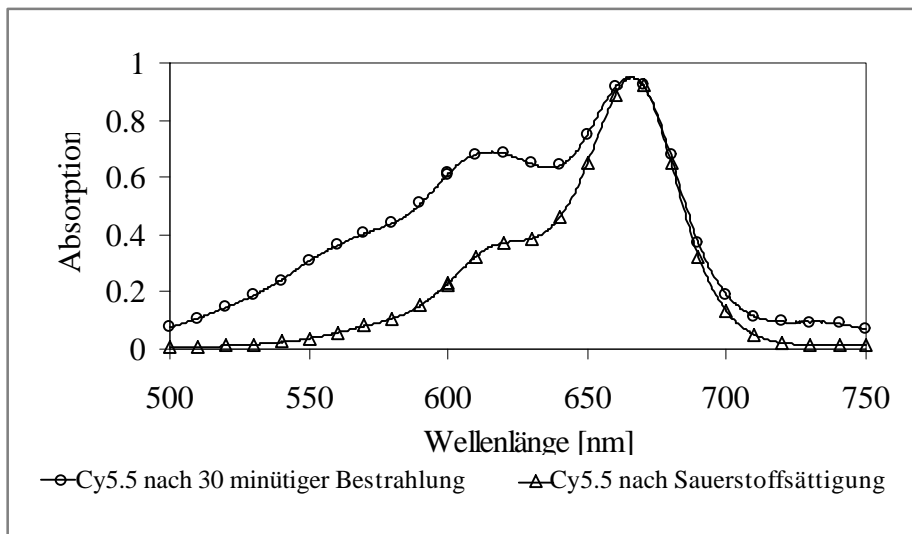
Die Farbstoffe wurden mit Licht bestrahlt, um ein Elektron auf ein höheres Energieniveau anzuheben. Von diesem aus sollte ein Elektronentransfer auf MV stattfinden, welches den Farbumschlag im System auslösen würde. Da Sauerstoff MV sehr effizient reoxidiert, mußte eine partielle O_2 -Elimination erreicht werden. Eine Sauerstoffabreicherung durch das Einblasen von Stickstoff in die Farbstofflösung war nicht möglich aufgrund des detergenshaltigen Mediums. Daher wurde die Farbstoff/MV-Probe eine längere Zeit (5 - 30 min) belichtet.

Durch die Bestrahlung sollte nach Elektronenübergang vom Farbstoff auf MV der Sauerstoff in direkter Umgebung von MV vorübergehend reduziert werden und als Oxidationsmittel nicht zur Verfügung stehen. -Mercaptoethanol (ME) wurde als Elektronendonator zur Reduktion des Farbstoffs eingesetzt.

Cy5.5

Cy5.5 wurde mit MV und ME 30 Minuten unter Weißlichtbestrahlung inkubiert und anschließend sofort ein Absorptionsspektrum gemessen. Danach wurde die Probe geschüttelt, um sie mit Sauerstoff abzusättigen und erneut die Absorption gemessen.

Abb. 4.9: Oxidation von Cy5.5



10 mM MV wurden mit 600 mM ME und 5 µM Cy5.5 in 10 mM Tris pH 7,0 30 min unter Bestrahlung inkubiert. Nach Ablauf der 30 min wurde ein Absorptionsspektrum gemessen. Nach Sättigung der Probe mit Sauerstoff (durch schütteln) wurde erneut die Absorption bestimmt.

Wie aus Abb. 4.9 zu entnehmen, konnte nach 30 min Excitation von Cy5.5 eine Reduktion des MV photometrisch sichtbar gemacht werden. Eine Elektroneninjektion des Farbstoffs konnte nachgewiesen werden. In weiteren Versuchen wurde gezeigt, daß ein direkter Elektronentransfer von ME auf MV ausgeschlossen werden kann. Auch war ein Elektronentransfer von Cy5.5 auf MV ohne zuvorige Belichtung nicht möglich. Es konnte damit gezeigt werden, daß nur angeregte Farbstoffmoleküle in der Lage sind, Elektronen an MV abzugeben.

Es wurde anschließend getestet, ob Cy5.5 auch gekoppelt an LHCII diese Elektronentransfereigenschaften besitzt. Diese Frage konnte jedoch nicht abschließend beantwortet werden, da LHCII bei Belichtung in der ME/MV-Umgebung sofort zerfiel.

Eine LHCII-Inkubation mit ME und/oder MV destabilisierte den Komplex nicht. Erst die Bestrahlung ließ den LHCII degenerieren. Möglicherweise kann MV die Chlorophylle im Komplex trotz Anwesenheit der Carotinoide oxidieren (bei freiem Chlorophyll konnte dies gezeigt werden). Es wäre auch möglich, daß das reduzierte MV selbst toxisch auf den Komplex wirkt, oder aber Sauerstoffradikale und/oder Singulett-Sauerstoff den LHCII degenerieren lassen.

Maleimido-BTI

Oxidation: Maleimido-BTI wurde in gleicher Weise wie Cy5.5 mit MV und ME zur Reaktion gebracht. Auch hier konnte nach 30-minütiger Inkubation im Licht eine deutliche MV-Absorption mit einem Maximum von 612 nm detektiert werden. Ein Elektronentransfer war

auch hier nur lichtgekoppelt und damit bei angeregtem Farbstoff möglich. Verwendet wurde in diesem und den nachfolgenden Versuchen Lhcb-1 gebundenes Maleimido-BTI in 0,1% SDS, 50 mM Tris, 384 mM Glycin und 1 mM EDTA. Elektronentransferversuche von Maleimido-BTI in THF schlugen fehl.

Reduktion: in einem weiteren Versuch wurde gezeigt, daß Maleimido-BTI durch Na-Dithionit reduziert werden kann. Bei der Farbstoffreduktion trat eine Wellenlängenverschiebung in Excitation und Emission auf. Dazu wurde von Lhcb-1-BTI ein Excitations- und ein Emissionsspektrum gemessen und anschließend die Probe mit einer Spatelspitze Na-Dithionit versetzt. Es folgte eine erneute spektroskopische Charakterisierung. Tabelle 4.4 zeigt deutlich die redoxabhängige Verschiebung des Excitations- und Emissionsmaximums.

Tabelle 4.4: Verschiebung der Excitations- und Emissionsmaxima von Maleimido-BTI nach Reduktion

	+ Na-Dithionit	- Na-Dithionit
Excitationsmaximum [nm]	691	698
Emissionsmaximum [nm]	747	735

Lhcb-1-BTI in 0,1% SDS, 50 mM Tris, 384 mM Glycin und 1 mM EDTA wurde spektroskopisch charakterisiert, mit einer Spatelspitze Na-Dithionit versetzt und erneut vermessen.

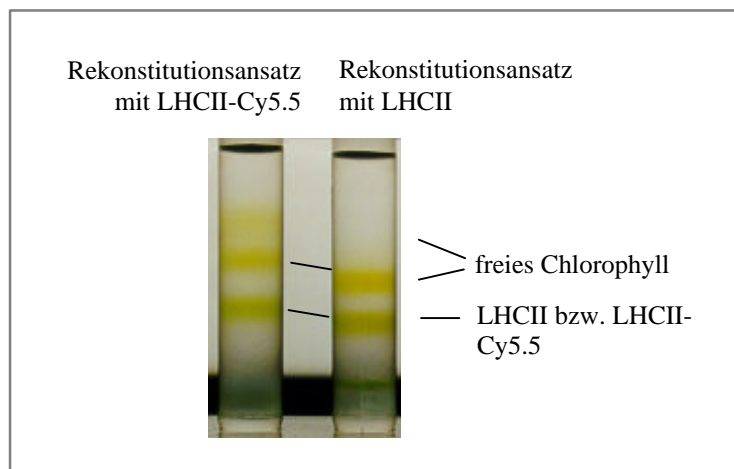
Um einen eventuellen Elektronentransfer von Maleimido-BTI auf Sauerstoff zu testen, wurde eine Verschiebung des Emissionsmaximums des Farbstoffs in THF nach Abreicherung von Sauerstoff durch Einblasen von Stickstoff in die Lösung überprüft. Es kam zu keinerlei Modifikationen der Farbstofffluoreszenz, was auf ein Unvermögen von Maleimido-BTI zum Elektronenübertrag auf Sauerstoff hindeutete. Da die Sauerstoffabreicherung jedoch nicht vollständig erfolgte, konnte diese Vermutung nicht abschließend bewiesen werden. Sauerstoffeliminierungsversuche mit Lhcb-1-BTI wurden aufgrund des detergenschaltigen Mediums nicht durchgeführt.

4.2 Energietransfer von LHCII auf verschiedene Energieakzeptoren

4.2.1 LHCII-Cy5.5

Lhcb-1-Cy5.5 wurde nach Kapitel 3.1.2.1 hergestellt, über eine präparative Gelelektrophorese von unmarkiertem Protein und freiem Farbstoff gereinigt (Kapitel 3.1.3.2, vgl. auch Wolf, 1998) und rekonstituiert. Mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation wurde LHCII-Cy5.5 anschließend von freiem Pigment und ungefaltetem Lhcb-1 separiert.

Abb. 4.10: Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation eines Rekonstitutionsansatzes mit LHCII bzw. LHCII-Cy5.5



LHCII und LHCII-Cy5.5 des Klons D7f.3 wurden nach der Rekonstitution über einen Saccharose-Dichtegradienten (0,6 M Saccharose, vgl. Kapitel 3.2.3) aufgereinigt.

Nach einer 16 stündigen Ultrazentrifugation bei $345.000\times g$ traten 2 – 3 chlorophyllhaltige Banden auf (vgl. Abb. 4.10). Wie schwach denaturierende Gele und fluorometrische Messungen zeigten, bestand nur die unterste Bande aus LHCII. Die darüber liegenden Banden enthielten freies Protein und ungebundenes Pigment. In manchen Versuchen trat eine weitere sehr scharfe grüne Bande kurz oberhalb des Röhrenbodens auf, welche Chlorophyll-Aggregate enthielt (nicht dargestellt).

LHCII-Cy5.5 war spezifisch N-terminal farbstoffmarkiert, wie Wolf (1998) in einem Trypsinverdau zeigen konnte. Die Komplexe konnten daher fluorimetrisch charakterisiert werden, um den Energietransfer von Chla auf den Farbstoff zu quantifizieren. Es wurden dazu vier N-terminal farbstoffmarkierte Mutanten verwendet. Die Mutanten unterschieden sich in der Länge des N-terminus, so daß eine relative Änderung der Cy5.5-Position zu den gebundenen Chlorophyllen zu erwarten war. Ziel war es, auf der einen Seite über diese relative Lageänderung des Energieakzeptors ein Konstrukt zu finden, in dem der Energietransfer besonders effizient erfolgt. Auf der anderen Seite wurde ein Erkenntnisgewinn bezüglich der Struktur des N-terminus erwartet. Aus der jeweils ermittelten Energietransfereffizienz und den zugrunde liegenden R_0 -Daten sollte der molekulare Abstand zwischen Donor und Akzeptor errechenbar werden.

Ebenfalls angestrebte Energietransfermessungen am pLHCII-Cy5.5 (LHCII mit N-terminalem Transitpeptid) mußten verworfen werden, da eine vollständige Abtrennung des unmarkierten pLhcb-1 von pLhcb-1-Cy5.5 in der präparativen Gelelektrophorese nicht gelang. Die Erhöhung des Proteinmolekulargewichts durch Kopplung von Cy5.5 war hier vermutlich nicht ausreichend für eine gelelektrophoretische Auftrennung.

Der Energietransfer wurde zunächst über die Veränderung der Donorquantenausbeute in Anwesenheit eines Energieakzeptors (Donorquenching) ermittelt, dann aber mittels stimulierter Akzeptorfluoreszenz quantifiziert (vgl. Kapitel 3.3.2).

4.2.1.1 Energietransferbestimmung im LHCII-Cy5.5 mittels Donorquenching

Um den Energietransfer in einer einzigen Probe (ohne Referenz) quantifizieren zu können, wurden verschiedene Methoden der Unterbrechung des Energietransfers von Chla auf Cy5.5 getestet. Ziel war es, die LHCII-Farbstoff-Komplexe zu zerstören, um die Interaktion der Chlorophylle mit dem Farbstoff zu unterbinden. Es wurden bei Raumtemperatur (297K) folgende Experimente durchgeführt:

- Proteinverdau durch Proteasen
- Denaturierung des LHCII durch Harnstoffzugabe
- Denaturierung mittels Detergens

Die Effizienz der verschiedenen Denaturierungsmethoden wurde durch den Verlust des komplexinternen Energietransfers von Chlb nach Chla bestimmt.

Proteinverdau

In diesen Versuchen wurde getestet, ob LHCII durch Proteasen verdaut werden kann, so daß Chlorophylle und vormals proteingekoppelter Farbstoff getrennt vorliegen. Es ist bekannt, daß Trypsin (Paulsen *et al.*, 1993) und Thermolysin (Kuttkat *et al.*, 1995) normalerweise nur den N-terminus des Komplexes verdauen, der überwiegende Teil des Proteins jedoch proteasegeschützt verbleibt. Damit wäre eine solche Proteasebehandlung eine elegante Lösung zur Abtrennung des Energieakzeptors unter gleichzeitiger Beibehaltung eines intakten LHCII (vgl. Kapitel 4.2.3). Doch wurde zum Teil mit so stark N-terminal verkürzten Mutanten des LHCII gearbeitet, daß eine proteolytische Abtrennung des Fluorophors nicht mehr möglich war. Die Farbstoffkopplungsstelle lag schon im proteasegeschützten Bereich des Proteins. Daher wurde mit einem großen Überschuß der verwendeten Proteasen versucht, den LHCII so stark zu verdauen, daß die Komplexstruktur völlig zerstört wird.

So wurde Trypsin in einer 15-fach größeren Konzentration eingesetzt als in den Versuchen von Kapitel 4.2.3 (vgl. auch Kapitel 3.2.6). Eine Endkonzentration von 1,5 mg/ml wurde verwendet. Trotz Erhöhung der Inkubationszeit auf 2 Stunden war ein vollständiger Verlust des Energietransfers von Chlb nach Chla nicht erreichbar, eine Zerstörung der LHCII-Struktur war damit nicht erfolgreich.

Thermolysin wurde in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml eingesetzt. Um eine vollständige Zerstörung des LHCII-internen Energietransfers zu erreichen, war eine 30 minütige Inkubation bei 60°C notwendig. Diese Erhitzung der Komplexe erhöhte jedoch die Chla-Fluoreszenz drastisch und erlaubte keine Quantifizierung des Donorquenchings in den LHCII-Cy5.5-Komplexen.

Proteinase K konnte LHCII unter keinen Umständen verdauen, eine Proteaseaktivität war nur an Lhcb-1 nachweisbar.

Pronase E konnte LHCII durch eine einstündige Inkubation bei 37°C verdauen, eine Modifikation der Chlorophyllfluoreszenz durch das Erhitzen mußte jedoch auch hier in Kauf ge-

nommen werden. Bei Inkubation der Protease mit LHCII in 60% Glycerin erfolgte dagegen kein Verdau.

Denaturierung durch Harnstoffzugabe

5M Harnstoff konnte LHCII nicht vollständig denaturieren.

Denaturierung mittels Detergens

1% SDS schädigte den Energietransfer von Chlb nach Chla in den aufgereinigten Komplexen so gut wie nicht, selbst eine anschließende 15 minütige Ultraschallbehandlung bei Raumtemperatur führte zu keiner Proteindenaturierung.

1% OG bzw. 1% NG führten innerhalb von 5 Minuten zu einem nahezu vollständigen Verlust des LHCII-internen Energietransfers. Nachfolgend konnte in über 40 Messungen gezeigt werden, daß die Zugabe von 1% OG die Chlorophyllfluoreszenz um $14,6 \pm 4,2\%$ erhöhte. Dies ist vermutlich auf eine veränderte Fluoreszenzquantenausbeute der Chlorophylle in Abwesenheit der Proteinumgebung zurückzuführen.

Da weder eine Denaturierung mit Harnstoff noch eine Komplexzerstörung mittels Proteasen erfolgreich waren, wurde der Energietransfer von Chla auf Cy5.5 nachfolgend über die LHCII-Denaturierung mittels 1% OG bestimmt. Die Veränderung der Quantenausbeute der Chlorophylle durch Separation vom Protein wurde in die Berechnungen zum Donorquenching mit einbezogen.

Dieses System funktionierte jedoch nur in den 297K-Messungen, bei 77K mußten andere Möglichkeiten der Bestimmung der Energietransfereffizienz gesucht werden. Die Zugabe von 1% OG bewirkte hier keine vollständige Unterbrechung des energetischen Übergangs. Vermutlich bewirkten hier die Anwesenheit von 60% Glycerin eine Stabilisierung der Komplexe (vgl. Fender, 2001), so daß eine Proteindenaturierung unterbunden wurde.

Es wurde daher eine Quantifizierung des Energietransfers mittels zweier identischer Proben getestet. Eine Probe wurde direkt mit Glycerin versetzt, die zweite wurde zuerst durch 1% OG verdaut und dann mit Glycerin für die 77K-Messungen gemischt. Auch dieses Vorgehen führte nicht zum Erfolg, die denaturierten Komplex zeigten bei 77K eine sehr starke Verminderung der Chla-Fluoreszenzquantenausbeute. Für die 77K-Messungen wurde daher die Methode des Donorquenchings verworfen.

Nachfolgend wurde auch für die 297K-Messungen die Bestimmung des Energietransfers mittels Donorquenching an einer einzigen Probe verworfen. Die Standardabweichung der Fluoreszenzquantenausbeutenerhöhung durch OG-Denaturierung war zu groß (29%) zur exakten Bestimmung der Unterschiede im Energietransfer verschiedener LHCII-Mutanten.

Der Energietransfer wurde daher entweder mit Hilfe der stimulierten Akzeptorfluoreszenz (vgl. Kapitel 4.2.1.2) oder über das Donorquenching nach Kapitel 3.3.1 bestimmt. Hier wurde die Energietransfereffizienz über einen Vergleich zweier LHCII-Lösungen gleichen Chlorophyllgehalts, einer Probe mit LHCII und einer mit LHCII-Cy5.5, bestimmt.

4.2.1.2 Energietransferbestimmung im LHCII-Cy5.5 über die stimulierte Akzeptorfluoreszenz

Zur genauen Bestimmung des Energietransfers von Chla auf Cy5.5 bei 297K und 77K wurde das in Kapitel 3.3.1 vorgestellte Verfahren zur Dekonvolution der Gesamtfluoreszenz in die Chla- und Cy5.5-Fluoreszenz verwendet. Nach Chla-Anregung traten in LHCII-Cy5.5 Fluoreszenzemissionen von Cy5.5 und Chla auf, die stark überlappten. Zur Berechnung des Energietransfers über die stimulierte Akzeptorfluoreszenz war daher eine Zerlegung des gemessenen Summenspektrums in seine beiden Unterspektren notwendig. Die Bestimmung der Energietransfereffizienz erfolgte dann nach Kapitel 3.3.2.

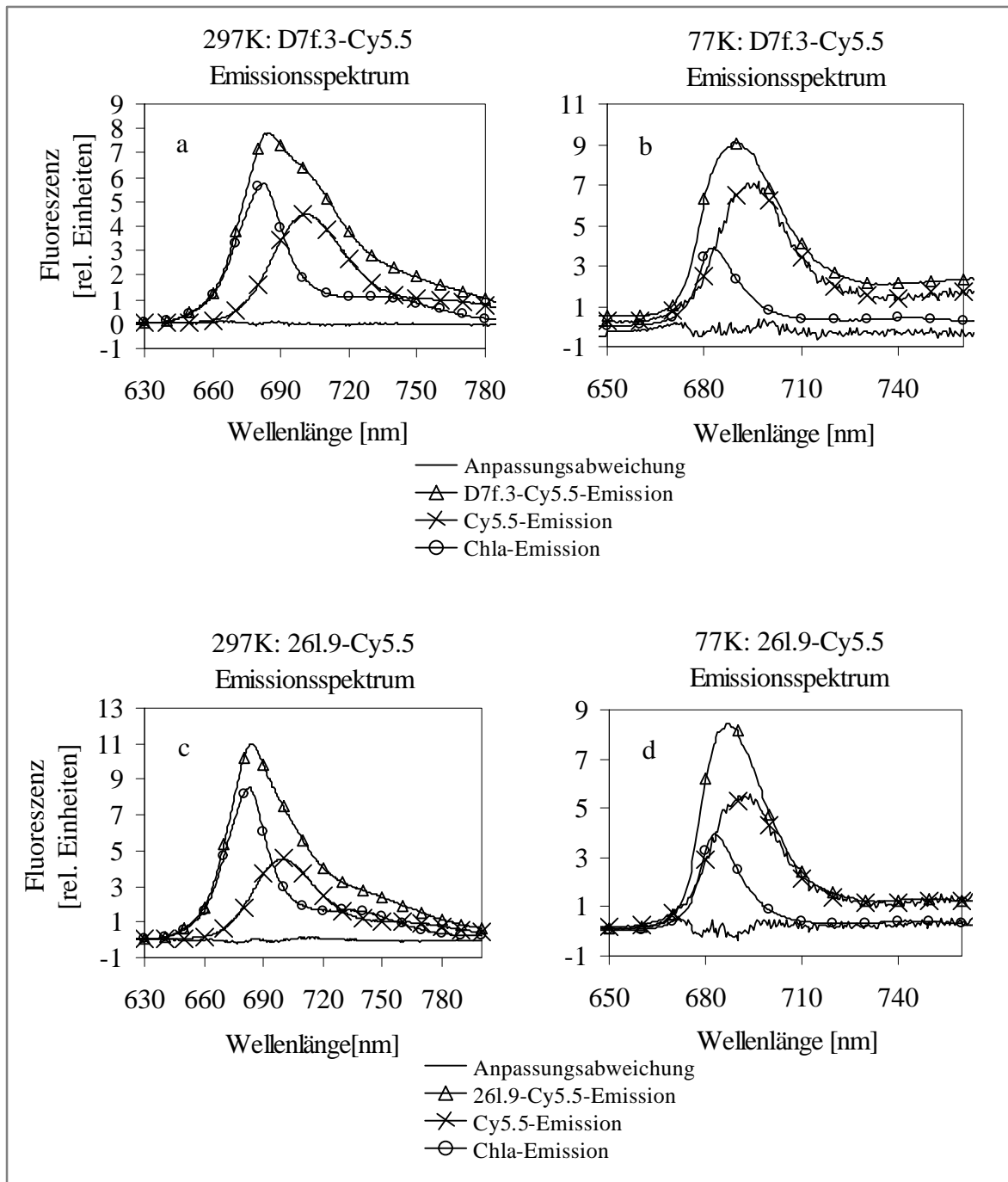
Um die Validität der kalkulierten Energietransfereffizienzen zu überprüfen, wurde der energetische Übergang von Chla auf Cy5.5 bei 297K am Wildtyp-LHCII-Cy5.5 (Klon D7f.3) mit Hilfe des Donorquenchings überprüft. Es wurde zum einen das Donorquenching in einer einzelnen Probe mittels OG-Denaturierung bestimmt, zum anderen wurde es durch den Vergleich zweier Proben gleichen Chlorophyllgehalts (nach Kapitel 3.3.1) gemessen. In allen Fällen wurden sehr ähnliche Energietransfereffizienzen errechnet, eine Abweichung $\pm 10\%$ trat auf.

Die bei der Energietransferkalkulation über die stimulierte Akzeptorfluoreszenz in Kauf genommenen Fehler waren systematischer Art, was die Vergleichbarkeit der Energietransfereffizienzen verschiedener Mutanten untereinander nicht beeinträchtigte.

So mußten zur Bestimmung des Energietransfers die Chla- und Cy5.5-Quantenausbeuten neu ermittelt werden, was in relativen Messungen geschah (Quantifizierungsungenauigkeiten vgl. Kapitel 4.1). Daneben ergaben sich bei der Zerlegung des Fluoreszenzspektrums in seine beiden Unterspektren Anpassungsabweichungen in der Größenordnung von 2% bei 297K und 4 - 5% bei 77K. Schließlich wurde bei 77K die am besten anpaßbare Kurvenform des Lhcb-1-Cy5.5-Emissionsspektrums zur Dekonvolution verwendet. Die Cy5.5-Emission war hier stark Anregungswellenlängen-abhängig (vgl. Kapitel 4.1.2). Es ist daher möglich, daß nicht das tatsächlich auftretende Cy5.5-Emissionsspektrum zur Dekonvolution verwendet wurde. Dies erhöhte den Fehler für die 77K-Messung.

In den vier folgenden Abbildungen (Abb. 4.11a-d) wird der Energietransfer exemplarisch für zwei Klone bei Raum- und Tieftemperatur dargestellt. Gegenübergestellt werden LHCII-Cy5.5-Emissionsspektren nach Chla-Anregung bei 410 nm vom Wildtypprotein D7f.3 und von 26l.9, einem Lhcb-1 mit kompletter Deletion der N-terminalen Proteindomäne (um 58 Aminosäuren verkürzt).

Abb. 4.11a-d: Energietransfer von Chla auf Cy5.5 in LHCII-Cy5.5-Konstrukten der Proteinmutanten 26l.9 (-58AS) und D7f.3 (Wildtyp) bei 297K und 77K



Lhcb-1-Cy5.5 wurde rekonstituiert und von freiem Pigment sowie ungefaltetem Protein in einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt. Um den Energietransfer von Chla auf Cy5.5 bei 77K und 297K zu quantifizieren, wurde der Komplex bei 410 nm angeregt und das Emissionsspektrum gemessen. Durch die Zerlegung des Fluoreszenzspektrums in die Chla- und Cy5.5-Fluoreszenz wurde eine Energie-transferquantifizierung über die stimulierte Akzeptorfluoreszenz möglich (vgl. Kapitel 3.3.2). Die Qualität der Dekonvolution ist in den Spektren als Anpassungsabweichung ((Chla- + Cy5.5-Fluoreszenz) - gemessene LHCII-Cy5.5-Emission) dokumentiert. Zur Energietransferbestimmung bei 77K wurden die Proben auf einen Glyceringehalt von 60% eingestellt.

Es wird deutlich, daß die Dekonvolution des Gesamtspektrums in die beiden Fluoreszenzanteile bei 297K deutlich besser gelang als bei 77K. Eine Zusammenstellung aller Daten beinhaltet Tabelle 4.5.

Tabelle 4.5: Energietransfer von Chla auf Cy5.5 in verschiedenen Mutanten des LHCII

Mutante	Energietransfer [in unabhängigen Messungen, %]	mittlerer Energie- transfer [%]	Standard- abweichung [%]	Anpassungs- abweichung ¹ [%]
bei 297K				
26g.11 (N-61)	23,8 21,3	22,5	-	1,4 1,9
26l.9 (N-58)	27,6 28,3 26,3 26,9	27,3	0,9	1,4 1,9 1,6 1,4
Sca (N-21)	27,4 27,8	27,6	-	1,9 2,1
1h.19 (N-11)	28,3 28,2	28,3	-	1,8 1,7
D7f.3 (Wildtyp)	35,8 35,5 34,8 35,2	35,3	0,4	1,2 1,3 2,0 1,6
bei 77K				
D7f.3 (Wildtyp)	68,3	-	-	4,7
26l.9 (N-58)	62,3	-	-	5,7

¹Anpassungsabweichung, die von der Zerlegung des gemessenen Spektrums in die beiden Einzelspektren herrührt.

Die Mutanten 26l.9 (N-58), Sca (N-21) und 1h.19 (N-11) zeigten bei Raumtemperatur einen vergleichbaren Energietransfer von ca. 28%. 26g.11 (N-61) und D7f.3 (der Wildtyp) differierten davon signifikant. Besonders erwähnenswert ist der deutlich vergrößerte Energietransfer im LHCII des Vollängenproteins (D7f.3-Cy5.5), der in Abb. 4.11 (a und b) auch ohne rechnerische Quantifizierung offenbar wird über die vergrößerte Akzeptorfluoreszenz.

Die Proteinmutante 26l.9 (N-58) und D7f.3 (Wildtyp) zeigten auch in 77K-Messungen eine Differenz in der Energietransfereffizienz abhängig von der Länge des N-terminus. Zwar verdoppelte sich hier der Energietransfer, der Unterschied in der Transfereffizienz beider Mutanten blieb jedoch bestehen.

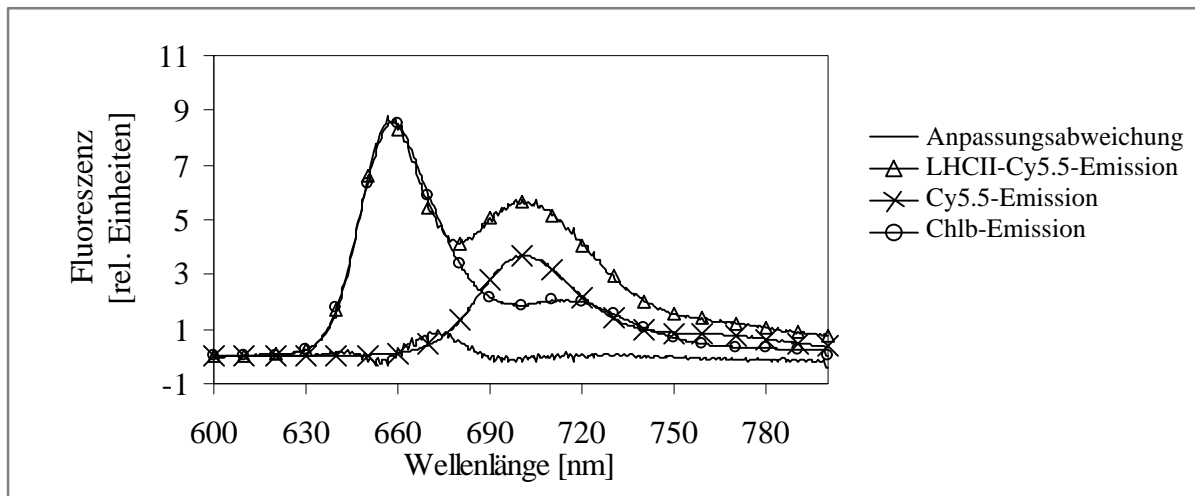
Während der Energietransfer bei 297K durch mehrmalige Versuche statistisch abgesichert wurde, handelt es sich bei den 77K-Werten um Einzelmessungen, die damit nur die Größenordnung des energetischen Übergangs widerspiegeln. Zudem gelten die oben vorgestellten systematischen Fehler hier in besonderem Maße.

4.2.1.3 Energietransfer von Chlb auf Cy5.5

Ob ein Energietransfer auch von Chlb auf Cy5.5 möglich ist, wurde an Chla-Mangelkomplexen untersucht. In LHCII-Komplexen normaler Pigmentzusammensetzung sollte die Anregungsenergie von Chlb auf Chla zu 100% übertragen werden, ein direkter Energietransfer von Chlb auf Cy5.5 ist hier nicht detektierbar.

Um den Energietransfer von Chlb auf Cy5.5 zu bestimmen, konnte die Tatsache genutzt werden, daß eine Rekonstitution von Lhcb-1 auch in Abwesenheit von Chla erfolgt (vgl. Fey, 2001; Kleima *et al.*, 1999). Lhcb1-Cy5.5 wurde daher mit Chlb und Carotinoiden rekonstituiert und anschließend der Energietransfer von Chlb auf Cy5.5 gemessen (Daten von H.Fey, 1999, im Rahmen eines Laborpraktikums erhalten).

Abb. 4.12: Energietransfer von Chlb auf Cy5.5 in LHCII-Cy5.5-Chla-Mangelkomplexen



LHCII-Cy5.5, hergestellt in einer Rekonstitution mit reinem Chlb und Xanthophyllen, wurde nach einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation fluorometrisch charakterisiert. Dargestellt ist das Emissionsspektrum nach Chlb-Anregung bei 464 nm, sowie die Zerlegung der Gesamtfluoreszenz in die Chlb- und Cy5.5-Fluoreszenz. Das Chlb-Fluoreszenzspektrum entstammt LHCII-Komplexen, die ebenfalls ohne Chla rekonstituiert und aufgereinigt wurden (Abbildung von H.Fey im Rahmen eines Laborpraktikums 1999 erstellt).

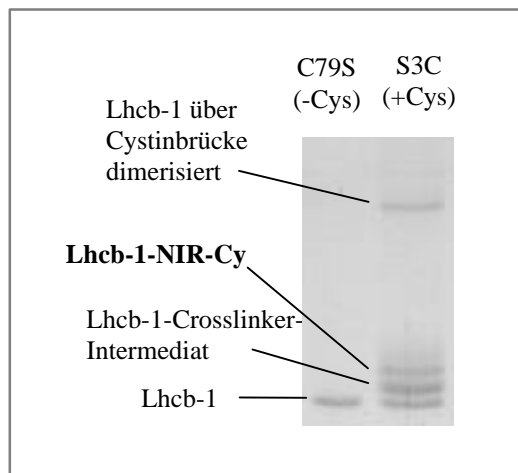
Wie man deutlich in Abb. 4.12 sehen kann, war auch ein direkter Energietransfer von Chlb auf Cy5.5 möglich, jedoch in deutlich verringertem Umfang. Eine genaue Quantifizierung des Übergangs war aufgrund der schlechten Dekonvolution des LHCII-Spektrums in die Chlb- und Cy5.5-Fluoreszenz schlecht möglich. Bei Annahme einer Quantenausbeute des Chlb von 0,1 im LHCII (Seely und Conolly, 1986, die Quantenausbeute wurde an Chlb in Ethanol gemessen und kann daher hier nur einen Näherungswert darstellen) wurde der Energietransfer mit ca. 15% bestimmt. Die Anpassungsabweichung lag bei 4,7%.

4.2.2 LHCII-NIR-Cy

4.2.2.1 Optimierung der NIR-Cy-Markierung von Lhcb-1

Ziel war es, NIR-Cy an einer definierten Stelle an das Protein zu koppeln. Nachdem eine selektiv N-terminale Markierung über die NCS-Gruppe bei keinem pH-Wert zu erreichen war, wurde der Farbstoff derart umfunktionalisiert, daß er eine SH-reaktive Maleimidgruppe trug (vgl. Kapitel 3.1.2.2). Damit sollte eine selektive Bindung des NIR-Cy an das N-proximale Cystein des Klons S3C erreicht werden. Im Gegensatz zu den Markierungsexperimenten von Stöcklin (2000) mit Cy5.5 konnten jedoch auf diese Weise nicht mehr als 20% des eingesetzten Proteins mit NIR-Cy markiert werden (Quantifizierung der Markierungseffizienz durch Abschätzung des Verhältnisses von markiertem zu unmarkiertem Protein in einem analytischen Polyacrylamidgel, vgl. Abb. 4.13).

Abb. 4.13: analytisches Polyacrylamidgel eines Markierungsansatzes mit NIR-Cy



C79S und S3C wurden mit umfunktionalisiertem NIR-Cy (nach Kapitel 3.1.2.2) zur Reaktion gebracht. Abweichend vom Standardrezept wurde die Proteinmarkierung bei pH 6,6 durchgeführt. Der molare Farbstoffüberschuß war doppelt so groß wie nach dem optimierten Rezept notwendig. Die anschließende Fällung wurde ohne DMSO-Waschungen durchgeführt. Auf das Gel wurden ca. 2 µg C79S und 4 µg S3C aufgetragen.

Wie aus Abb. 4.13 hervorgeht, wurde S3C selektiv über die SH-Gruppe markiert. C79S, welches kein Cystein besitzt, zeigte neben der Proteinbande keine weitere Bande, die von markiertem Lhcb-1 stammen könnte. Nach der Farbstoffreaktion von S3C traten dagegen mehrere Banden auf.

Die Detektion der eigentlichen Lhcb-1-NIR-Cy Bande gelang mittels präparativer Gelelektrophorese. Hier wurden die einzelnen Banden in unterschiedliche Fraktionen aufgetrennt und spektroskopisch untersucht. Nur die in Abb. 4.13 als „Lhcb-1-NIR-Cy“ markierte Bande zeigte eine ausgeprägte NIR-Cy-Absorption (nicht dargestellt). Aber auch ein direkter Gelnachweis war möglich, wenn auch nur bei einer, im Gellaufverhalten vergleichbaren, IRD38-Lhcb-1-Markierung. IRD38 hat eine sehr ähnliche Struktur wie NIR-Cy und wurde in gleicher Weise umfunktionalisiert. Nach Zugabe von NaOH lagerte sich IRD38 zu dem „Blue product“ um (vgl. Kapitel 4.1.2), welches im Gel sichtbar war aufgrund seiner zu kürzeren Wellenlängen verschobenen Absorption. IRD38-Lhcb-1 konnte damit im Gel lokalisiert werden (vgl. Kapitel 4.2.3).

Aufgrund der geringen Markierungsausbeute wurden die Versuchsbedingungen der Farbstoff-Proteinreaktion auf folgende Art und Weise modifiziert.

Zunächst wurde die Detergenumgebung variiert. Die Anwesenheit von OG war aufgrund der vier negativ geladenen Sulfonylgruppen erforderlich, um die SDS-haltigen Detergensemizellen des Lhcb-1 in ihrer Ladungsdichte abzuschwächen. Es wurde daher nur die Konzentration von SDS und OG variiert, nicht aber gänzlich auf OG verzichtet. Die Erhöhung des Detergensgehalts von 0,1% SDS und 1% OG auf 0,2% SDS und 2% OG brachte eine geringfügige Erhöhung der Markierungsausbeute.

Nach Umfunktionalisierung war der Farbstoff in Detergens oder organischem Lösungsmittel schlecht löslich (schon nach Zugabe von SMPB nahm Löslichkeit stark ab). Bei Zugabe des reduzierten Lhcb-1 zum Farbstoff sedimentierte das Protein darüber hinaus recht schnell mit einem Teil des NIR-Cy. Wenn es gelänge, das Protein-Farbstoffgemisch besser in Lösung zu halten, könnte die Markierungseffizienz möglicherweise erhöht werden. Aus diesem Grund wurde eine Proteinmarkierung in 6 M Guanidinhydrochlorid oder 8 M Harnstoff durchgeführt. Mit Tetramethylrhodamin-Maleimid konnte gezeigt werden, daß prinzipiell eine Farbstoffmarkierung in dieser Umgebung möglich ist, die Markierungsausbeute lag jedoch bei unter 50% (die Markierungsausbeute liegt unter Standardbedingungen bei 80 - 90%, vgl. Huschenbett, 2001). Auch bei der NIR-Cy-Markierung wurde eine deutlich verminderte Farbstoffkopplung an das Protein detektiert.

Nichtsdestotrotz wurde dieser Weg weiter beschritten, da es mit Hilfe des Harnstoff gelang, sowohl Farbstoff als auch Protein dauerhaft in Lösung zu halten. In den folgenden Versuchen wurde das Protein in einem Medium aus 2% OG und 0,2% SDS reduziert und anschließend mit dem Farbstoff, gelöst in unterschiedlichen Mengen und Konzentrationen von Harnstoff, versetzt. Es konnte jedoch keine Verbesserung der Markierung erreicht werden, so daß davon ausgegangen werden mußte, daß die schlechte Farbstofflöslichkeit in den vorherigen Versuchen nicht der Grund für die geringe NIR-Cy-Bindung gewesen war.

Einen sehr entscheidenden Anteil an der Höhe der Markierungsausbeute hatte die Lagerung des markierten Proteins nach Beendigung der Reaktion. In ersten Versuchen erfolgte sie bei -20°C in 1% SDS. Hierbei wurde der Anteil des proteingebundenen Farbstoffs im Zeitraum von Tagen bis Wochen kontinuierlich schlechter. Die Zugabe von Puffer vergrößerte die Stabilität deutlich, so daß im folgenden das Protein immer in 2% SDS und 100 mM Tris/HCl, pH 9,0 bei -20°C gelagert wurde.

Um unspezifische Farbstoffkopplungen am Lhcb-1 ausschließen zu können, wurde nach der Fällung des Lhcb-1-NIR-Cy-Markierungsansatzes ein intensives Waschen des Proteins in Ethanol und anschließend DMSO durchgeführt. Nach Auskunft des Farbstoffherstellers (L.Strekowski, Department of Chemistry, Georgia State University, USA) neigt NIR-Cy stark zu Adhäsionen an Oberflächen (gilt auch für IRD 38) und könnte daher auch noch nach einer präparativen Gelelektrophorese unspezifisch an Lhcb-1 des Markierungsansatzes angelagert sein. In den Markierungsansätzen von Lhcb-1-BTI (Kapitel 4.2.4) und Lhcb-1-Cy5.5 (Kapitel 4.2.1) konnte dagegen immer eine vollständige Elimination des freien Farbstoffs erreicht werden.

Durch DMSO gelang es auch für dieses Lhcb-1-Farbstoff-Konstrukt, noch unspezifisch am Protein befindlichen Farbstoff abzutrennen. Leider war der Proteinverlust (markiert wie unmarkiert) dabei mit ca. 50% auch sehr hoch. Das fehlende Protein konnte im DMSO-Überstand detektiert werden.

In anschließenden Trypsinverdauexperimenten mit IRD38, der in fast allen Versuchen das selbe Verhalten wie NIR-Cy zeigte, konnte danach keine weitere unspezifische Bindung von Farbstoff an LHCIII detektiert werden (vgl. Kapitel 4.2.3).

4.2.2.2 Energietransfer von Chla auf NIR-Cy in LHCII-Komplexen

NIR-Cy-Lhcb-1, gereinigt von freiem Farbstoff und unmarkiertem Protein (durch Proteinfällung und präparativer Gelelektrophorese nach Kapitel 3.1.3), wurde rekonstituiert und über einen Saccharose-Dichtegradienten von freiem Chlorophyll und ungefaltetem Protein befreit (vgl. LHCII-Cy5.5). Die farbstoffhaltigen Komplexe wurden im Anschluß fluorometrisch und photometrisch charakterisiert.

Trotz aller Optimierungs- und Reinigungsschritte gelang es nicht, reproduzierbare Energietransfereffizienzen zu bestimmen, wie es für Cy5.5 und Maleimido-BTI der Fall war. Der Energietransfer nahm über mehrere Monate hinweg ab (vgl. Versuch 1 – 5 in Tabelle 4.7; in dieser Reihenfolge innerhalb von fünf Monaten gemessen).

Es schien, als sei der Farbstoff partiell degradiert, zum einen gelang die Proteinmarkierung mit immer schlechterer Ausbeute, zum anderen fluoreszierte der an LHCII gekoppelte Farbstoff immer geringer und hatte schlechtere Energieakzeptoreigenschaften. Daneben gaben Absorptionsmessungen Rätsel bezüglich des Farbstoffgehalts am Protein auf. In Tabelle 4.6 ist der NIR-Cy-Gehalt pro LHCII in verschiedenen Messungen dargestellt, nachdem zuvor durch ein analytisches Gel nach präparativer Gelelektrophorese eine vollständige Markierung am Apoprotein über das veränderte Molekulargewicht des Lhcb-1 überprüft worden war (vorausgesetzt der NIR-Cy-Extinktionskoeffizient ändert sich nicht durch Rückfaltung des Proteins).

Tabelle 4.6: Verhältnis von LLHCII zu NIR-Cy in LHCII-NIR-Cy-Komplexen

Versuch	NIR-Cy-Konzentration [μM]	LHCII-Konzentration [μM]	Verhältnis von LHCII zu NIR-Cy
1	0,15	0,33	1 : 0,45
2	0,08	0,16	1 : 0,50
3	0,015	0,09 ¹	1 : 0,16 ¹
4	0,02	0,06	1 : 0,30
5	0,015	0,08 ¹	1 : 0,19 ¹

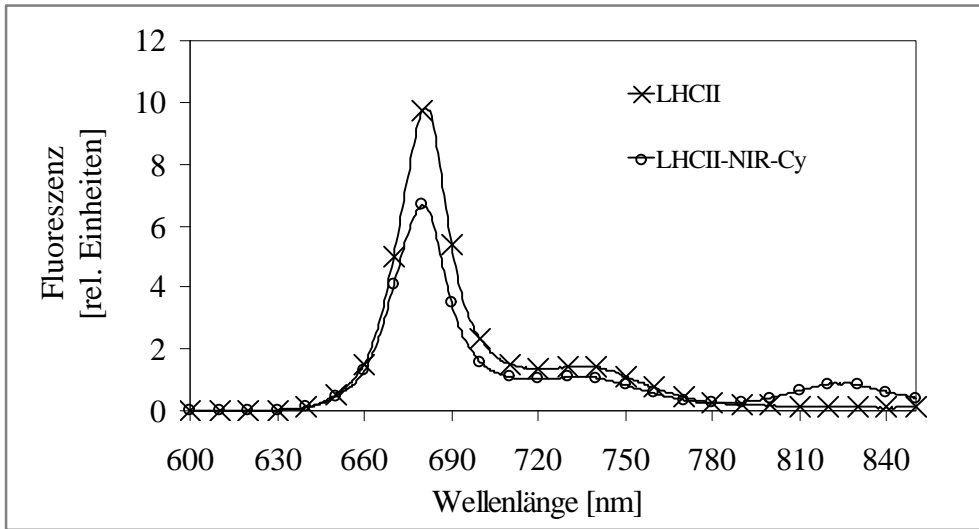
Der Gehalt an LHCII und NIR-Cy in den LHCII-NIR-Cy-Komplexen wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die LHCII-Absorption bei 670 nm mit dem Extinktionskoeffizient von $546.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ verrechnet (Kühlbrandt und Butler, 1988) und das NIR-Cy-Maximum bei ca. 809 nm mit $198.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.¹NIR-Cy-Absorption sehr gering und damit nicht präzise bestimmbar

Wie der Tabelle 4.6 zu entnehmen, sank im Laufe der Zeit der am LHCII detektierbare Farbstoff auf weniger als 1/4 pro Protein ab. Von Fluka durchgeführte HPLC-Analysen bestätigten dann die Vermutung, der Farbstoff sei zerfallen. Der Verkauf ist seitdem bis auf weiteres gestoppt. IRD38 wurde zum Ersatzfarbstoff (vgl. Kapitel 4.2.3).

Der Energietransfer von Chla auf NIR-Cy wurde über das Donorquenching (nach Kapitel 3.3.1) bestimmt, einmal wurde zusätzlich der Energietransfer über die stimulierte Akzeptorfluoreszenz ermittelt. Dazu wurde ein Vergleich von Absorptions- und Excitationsspektrum herangezogen (vgl. Kapitel 3.3.2). Auf eine Quantifizierung des Energietransfers über die stimulierte Akzeptorfluoreszenz nach Art der LHCII-Cy5.5-Komplexe (Vergleich der Chla- und der Farbstofffluoreszenz) mußte verzichtet werden, da mit dem Photomultiplier (vgl. Kapitel 2.1) die NIR-Cy-Quantenausbeute zu ungenau bestimmbar war.

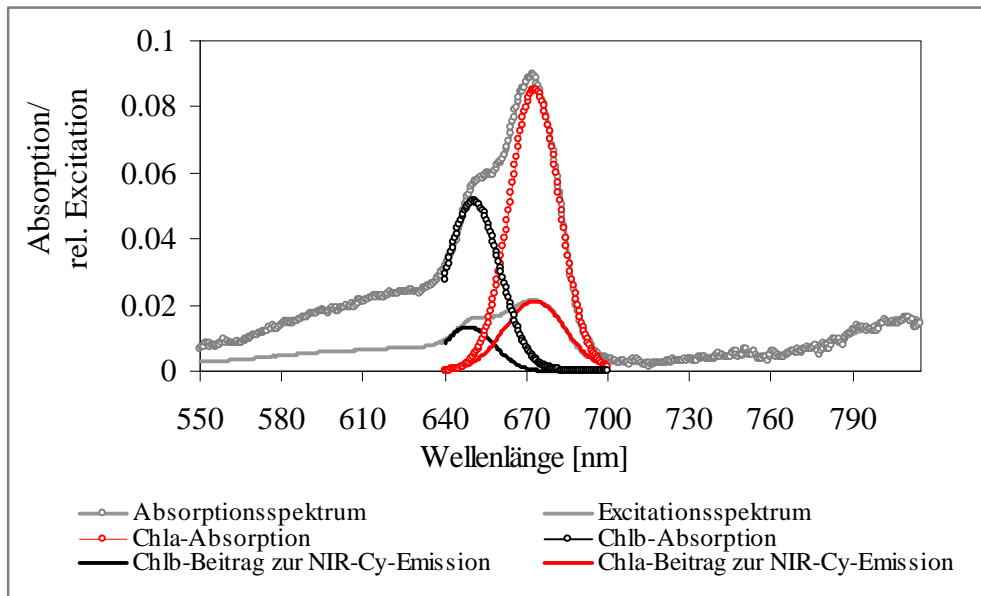
In den Abbildungen 4.14 und 4.15 werden die beiden Methoden zur Energietransferberechnung vorgestellt.

Abb. 4.14: Löschung der Chla-Fluoreszenz durch Energietransfer auf NIR-Cy (Donor-Quenching): Emissionsspektrum von LHCII und LHCII-NIR-Cy nach Chla-Anregung bei 430 nm



LHCII- und LHCII-NIR-Cy-Komplexe wurden über einen Saccharose-Dichtegradienten aufgereinigt und auf gleichen Komplexgehalt über die Chlorophyllabsorption bei 670 nm eingestellt. Eine fluorometrische Detektion der Chla- und NIR-Cy-Emission erfolgte nach Kapitel 3.3.1. Die Excitation von Chla erfolgte bei 430 nm.

Abb. 4.15: Vergleich von Excitationspektrum und Absorptionsspektrum von LHCII-NIR-Cy zur Energietransferberechnung über die stimulierte Akzeptorfluoreszenz



Es wurde von den aufgereinigten LHCII- und LHCII-NIR-Cy-Komplexen ein Excitationspektrum (Emissionswellenlänge 824 nm, Integrationszeit 0,5 sec, Mittelung dreier Messungen) und ein Absorptionsspektrum gemessen. Beide Spektren wurden auf maximale NIR-Cy-Absorption bzw. -Excitation normiert und dann die Chlorophyllabsorption bzw. -excitation zueinander ins Verhältnis gesetzt. Da nicht die Summe des Energietransfers von Chla und Chlb auf NIR-Cy untersucht werden sollte, mußten die Spektren in ihren Chla- und Chlb- Anteil dekonvolviert werden, was mittels Gaußkurven geschah. Die Anpassungsabweichung der gefitteten Kurven gegenüber den gemessenen lag bei 2%. Die Dekonvolution fand nur bei 640-700 nm statt, da sonst noch der Einfluß der Carotinoide hätte mit berücksichtigt werden müssen. Der Energietransfer wurde nach Kapitel 3.3.2 berechnet.

Tabelle 4.7 stellt die mittels Donorquenching und stimulierter Akzeptorfluoreszenz errechneten Energietransferdaten vor.

Tabelle 4.7: Quantifizierung des Energietransfers mittels Donorquenching und über die stimulierte Akzeptorfluoreszenz

Versuch	Energietransfer bei 297K (über Donorquenching bestimmt) [%]	Energietransfer bei 77K (über Donorquenching bestimmt) [%]	Energietransfer bei 297K (über stimulierte Akzeptorfluoreszenz bestimmt) [%]
1	28	36	-
2	36 ¹	38	29 ^{1,2}
3	12	-	-
4	21	26	-
5	8	-	-

Die Quantifizierung des Energietransfers erfolgte in fünf verschiedenen Versuchen über den Zeitraum von fünf Monaten hinweg.

¹Fehler durch Absorption von >0,1 (0,14), Reabsorption nicht ausgeschlossen

²Energietransfer vermutlich unterschätzt, da im Excitationspektrum eine Emissionswellenlänge von 824 nm verwendet wurde, der Farbstoff jedoch bei 835 nm nach Korrektur gegen die wellenlängenabhängigen Schwankungen der Detektorsensibilität maximal fluoresziert.

Verrechnet man die apparente Markierungsrate mit dem Energietransfer um abzuschätzen, wie hoch dieser bei Kopplung eines intakten Farbstoffs pro Protein wäre, erhält man für die Messungen 1-4 eine Effizienz von 60-70%. Messung 5 fällt mit 42% etwas aus dem Rahmen. Insgesamt wäre also NIR-Cy vermutlich ein guter Energieakzeptor gewesen. Ein Indiz für einen Energierücktransfer vom Farbstoff auf die Chlorophylle wurde nicht gefunden. Die Energietransfereffizienz lag bei 77K nicht deutlich über der bei 297K (im Gegensatz zu den LHCII-Cy5.5-Versuchen), das R_0 lag für den Rücktransfer bei 0.

4.2.3 LHCII-IRD38

IRD38 hat ähnliche Absorptions- und Emissionseigenschaften wie NIR-Cy und wurde daher nach Abbruch der NIR-Cy-Versuche (vgl. Kapitel 4.2.2) als Energieakzeptor verwendet. Nach Modifikation der Rezeptur zur NIR-Cy-Proteinmarkierung (vgl. Kapitel 3.1.2.2) war eine IRD38-Kopplung an Lhcb-1 in gleicher Effizienz möglich (bestimmt durch die Separation von markiertem und unmarkiertem Protein in einem analytischen Polyacrylamidgel). Eine Abtrennung des markierten Proteins vom unmarkierten Lhcb-1 scheiterte jedoch an der Sensitivität des Farbstoffs gegenüber hohem pH und/oder primären Aminogruppen. Keines der Standard-Gelelektrophoresesysteme operiert, ohne zumindest eines der beiden Abschlußkriterien zu verletzen. Es wurde schließlich ein analytisches Natriumphosphatgel getestet, welches eine Gelmatrix aus 10% Polyacrylamid, 100 mM NaP pH 7,0 und 0,1% SDS besaß und einen Elektrophoresepuffer aus 0,1% SDS und 80 mM NaP, pH 7,0. Eine Auftrennung des Lhcb-1-Markierungsansatzes in seine beiden Anteile aus markiertem und unmarkiertem Protein konnte nicht erreicht werden. Das Gel schmierte stark und lief trotz hoher Stromstärken sehr langsam. Eine Fokussierung der Probe durch Vorschalten eines 4%igen Sammelgels brachte auch keinen Erfolg. Ein präparatives Gel scheiterte völlig. Das Protein verließ die Gelmatrix nicht wieder.

Da eine mögliche Nutzung der LHCII-Farbstoff-Konstrukte auf dem Gebiet der Einzelmolekülspektroskopie lag, wurde im Fall des LHCII-IRD38 auf weitere Versuche zur Proteinreinigung verzichtet. Für die Untersuchung einzelner Komplexe war es nicht essentiell, daß jedes LHCII einen Farbstoff trug. Durch die deutlich unterscheidbaren Absorptionsmaxima der Chlorophylle und des Farbstoffs könnte an jedem einzelnen Komplex überprüft werden, ob eine Farbstoffmarkierung vorliegt oder nicht.

Wichtig dagegen war eine möglichst vollständige Abtrennung des freien Farbstoffs aus dem Lhcb-1-IRD38-Markierungsansatz (vgl. Kapitel 3.1.3.1). Gerade unspezifische Markierungen, wie sie schon in Kapitel 4.2.2 dargelegt wurden, würden die Aussagefähigkeit einzelnmolekular gewonnener Erkenntnisse deutlich herabsetzen.

Um die Abtrennung des freien Farbstoffs vom Lhcb-1-IRD38 nachzuweisen, wurden 5-10 µl eines Proteinmarkierungsansatzes mit einigen µl 50 mM NaOH versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Dabei setzte sich der Farbstoff zum „Blue product“ um, welches im nachfolgenden SDS-Polyacrylamidgel sichtbar war aufgrund der Verschiebung des Absorptionsmaximums zu kürzerwelligen Bereichen. Es konnte so gut wie keine freie Farbstoffbande in der Lauffront des Gels detektiert werden (Probenauftrag in bromphenolfreiem Puffer), lediglich der Proteingekoppelte Farbstoff wurde sichtbar (nicht dargestellt).

Im folgenden wurde das Gemisch aus Lhcb-1 und Lhcb-1-IRD38 rekonstituiert und über einen Saccharose-Dichtegradienten von freiem Pigment und ungefaltetem Protein befreit (vgl. Kapitel 4.2.1). Eine exakte Quantifizierung des Energietransfers über Fluoreszenzmessungen am Fluoromax-2 war aufgrund des großen Überschusses an unmarkiertem LHCII nicht möglich. Aus vier gemessenen Energietransfereffizienzen war lediglich eine Abschätzung durchführbar.

Tabelle 4.8: Apparenter Energietransfer von Chla auf IRD38 in LHCII-IRD38 bei 297K

Versuch	apparenter Energietransfer aus Donorquenching bestimmt [%]
1	9 ¹
2	7 ¹
3	16
4	13

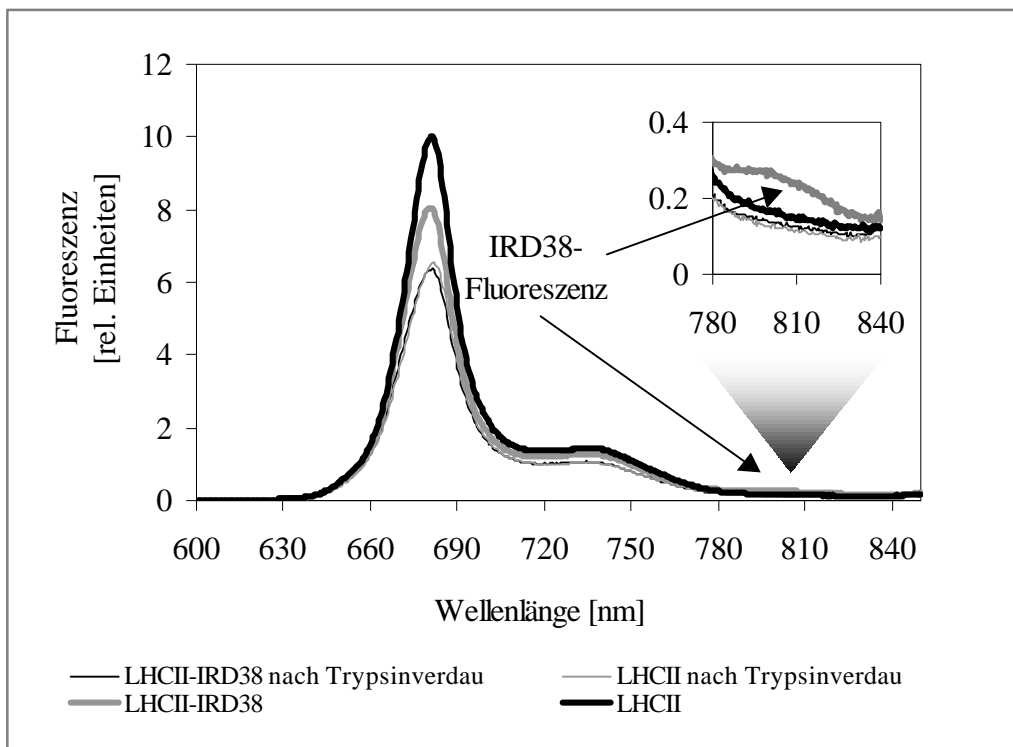
¹Lhcb-1-IRD38 aus gleichem Markierungsansatz

Der Energietransfer von Chla auf IRD38 wurde an LHCII-Komplexen bestimmt, die nur zu 5-10% farbstoffmarkiert waren. Freier IRD38 und überschüssiges Pigment waren dem System zuvor entzogen worden.

Wie Tabelle 4.8 zu entnehmen, streuten die Energietransfereffizienzen stark, was auf unterschiedliche Anteile von Lhcb-1-IRD38 am Gesamtprotein schließen ließ.

Da im Durchschnitt nur 5-10% des in die Rekonstitution eingesetzten Proteins eine Farbstoffmarkierung trug, kann vermutet werden, daß die Energietransfereffizienz von reinem LHCII-IRD38 in der gleichen Größenordnung (60-70%) wie im LHCII-NIR-Cy-Konstrukt liegen könnte. 77K-Energietransfermessungen wurden nicht durchgeführt.

Abb. 4.16 Löschung der Chla-Fluoreszenz durch Energietransfer auf IRD38 in LHCII-IRD 38 sowie Trypsinverdau der Komplexe



LHCII und LHCII-IRD38 aus Saccharose-Dichtegradienten wurden photometrisch auf gleiche Chlorophyllkonzentration eingestellt und anschließend fluorometrisch charakterisiert. In Emissionsspektren der LHCII-IRD38-Proben konnte nach Chla-Anregung bei 437 nm eine Chla- und eine IRD38-Fluoreszenz detektiert werden. Die LHCII- und LHCII-IRD38-Proben wurden nachfolgend nach Kapitel 3.2.6 tryptisch verdaut und anschließend erneut bei 437 nm angeregt.

Trotz des geringen Energietransfers konnte in den Emissionsspektren nach Chla-Anregung eine stimulierte Akzeptorfluoreszenz detektiert werden (vgl. Abb. 4.16). Ein Trypsinverdau bewies zusätzlich (ähnlich den LHCII-BTI-Versuchen in Kapitel 4.2.4), daß dieser Energie-

übergang spezifisch war. Es wurde dazu eine LHCII- und eine LHCII-IRD38-Probe gleichen LHCII-Gehalts N-terminal mit Hilfe obiger Protease verdaut und danach der Energietransfer nach selektiver Anregung von Chla bestimmt. Der Trypsinverdau verminderte in beiden Proben die Chlorophyll-Fluoreszenz, was zum einen auf einen Verdünnungseffekt zurückzuführen war. Zum anderen deutete es zusätzlich auf eine partielle Destabilisierung des LHCII hin. Jedoch erreichten beide Arten der Komplexe nach 30 minütiger Proteaseinkubation gleiche Chlorophyll-Quantenausbeuten. Ein Donorquenching durch Energietransfer auf IRD38 war im Gegensatz zu den Messungen vor Proteaseverdau nicht mehr zu beobachten. Auch die IRD38-Fluoreszenz selbst war erloschen.

Ein Einsatz dieses LHCII-Farbstoff-Konstrukts für die Einzelmolekülspektroskopie wurde daher für möglich erachtet und erste Testversuche durchgeführt. Besonders interessant an dieser LHCII-Farbstoff-Konstruktion war die gleichzeitige, selektive Anregbarkeit von Chlorophyll und Farbstoff über zwei verschiedene Farbstofflaser. Die Absorption von Donor und Akzeptor war in diesem System deutlich von einander getrennt (vgl. Kapitel 4.1.1). Schwierigkeiten traten bei der Vermessung der Konstrukte trotz allem auf. Der Farbstoff erwies sich als sehr lichtempfindlich und blich innerhalb weniger Sekunden in einer Messung aus (daher sind hierzu keine Daten in Kapitel 5 dargestellt).

4.2.4 LHCII-BTI

4.2.4.1 Kopplung einer SH-reaktiven Gruppe an BTI

Da sowohl in den LHCII-Cy5.5- als auch den LHCII-NIR-Cy- und LHCII-IRD38-Komplexen keine Energietransfereffizienzen von nahe 100% für den Übergang von Chla auf den Farbstoff erreicht werden konnten, wurden Versuche mit BTI angestrebt. BTI hat Absorptions- und Emissionsmaxima im gewünschten Wellenlängenbereich und ist einer primären Aminogruppe als funktioneller Gruppe ausgestattet.

Es sollte eine Umfunktionalisierung dieser Aminogruppe in eine Maleimidgruppe stattfinden, um eine selektive, ortsspezifische Kopplung des Farbstoffs an Lhcb-1 zu ermöglichen. Es wurden drei Wege beschrritten.

- a.) Reaktion der primären Aminogruppe mit einem NHS-Ester
- b.) Reaktion der primären Aminogruppe mit einem Halogensäurehalogenid
- c.) Reaktion der primären Aminogruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)

zu a.) Es wurde eine Verknüpfung von BTI mit m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester (MBS) bzw. Succinimidyl 4-[p-maleimidophenyl]-butyrat (SMPB) angestrebt und verschiedene Reaktionsbedingungen (Temperaturen bis 60°C, Variation des Mengenverhältnisses von Crosslinker zu Farbstoff, unterschiedliche Lösungsmittel- und Detergensbedingungen) getestet. Trotzdem konnte in massenspektroskopischen Untersuchungen (FD-Messungen, nicht dargestellt) in keinem Fall das gewünschte Produkt detektiert werden. Das primäre Amin lag nicht aliphatisch, sondern gekoppelt an einen Aromaten vor und war daher vermutlich zu reaktionsträge für eine Reaktion mit dem NHS-Ester.

zu b.) Es wurden Versuche mit Bromacetylbromid (Merck) und Jodacetylchlorid (selbst synthetisiert aus Jodessigsäure und Thionylchlorid) durchgeführt. Dazu wurden 0,9 µmol BTI mit 115 µmol Jodacetylchlorid bzw. Bromacetylbromid und 16 oder 20 µmol Tributylamin in 250 µl THF 0,5 - 1 Stunde unter Rühren inkubiert. Tributylamin hatte dabei die Aufgabe eines Protonenfängers, welches den bei der Umsetzung entstehenden Halogenwasserstoff neutralisieren sollte.

Die Umsetzung mit Bromacetylbromid funktionierte problemlos. Massenspektrometrisch konnte anschließend Bromacetamido-BTI nachgewiesen werden. Bromacetamid war jedoch nicht reaktiv genug, um im nächsten Schritt mit der Mercaptogruppe des Lhcb-1 zu reagieren. Die Umlagerung mit Jodacetylchlorid führte laut massenspektrometrischer Analyse zur Bildung von Chloracetamido-BTI. Wahrscheinlich hatte Tributylamin das freigesetzte HCl nicht ausreichend abgefangen, so daß es zu einem Austausch von Jod gegen Chlor am Halogensäurehalogenid kam. Chloracetamid ist noch reaktionsträger als Bromacetamid, so daß eine BTI-Kopplung an Lhcb-1 mißlang.

Die Kopplung von Jodacetylchlorid an BTI wurde nachfolgend in reinem Pyridin als Protonenfänger durchgeführt („Einhornreaktion“). Dies führte laut Massenspektrometrie zur Bildung von halogenfreiem Acetoamido-BTI.

Alle Farbstoffumsetzungen wurden vor der massenspektroskopischen Charakterisierung über eine Silicatsäule mittels Chloroform aufgereinigt.

zu c.) BTI sollte vermittelt durch DCC und DMAP (Dimethylaminopyridin) mit Maleimidopropionsäure (BMPA) eine Peptidbindung eingehen. Dazu wurde BMPA in 1,6-fachem molaren Überschuß zu einer BTI-Dichlormethanolösung gegeben und durch Zusatz von DMAP und DCC die Reaktion gestartet. Massenspektrometrisch konnte jedoch keine Veränderung des BTI detektiert werden.

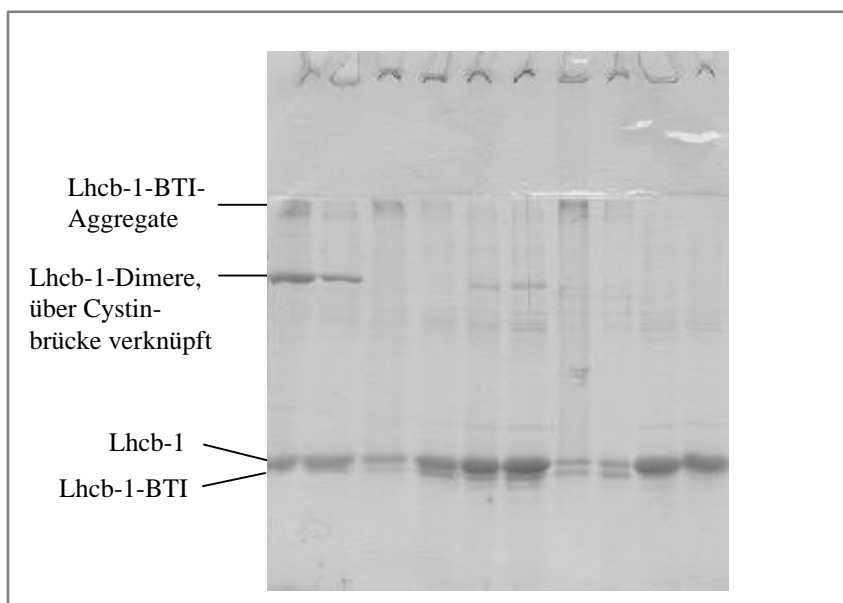
Daraufhin wurde von C. Kohl, MPI für Polymerforschung, Mainz, der Farbstoff neusynthetisiert unter gleichzeitigem Einbau einer Maleimidgruppe. Im folgenden wird dieser Farbstoff Maleimido-BTI genannt (bei Kopplung an Lhcb-1 jedoch nur Lhcb-1-BTI).

4.2.4.2 Erstellung eines biomimetischen Modells aus LHCII und Maleimido-BTI

Reaktion von Maleimido-BTI mit Lhcb-1 sowie Separation des markierten Proteins vom unmarkierten

Lhcb-1 wurde unter verschiedenen Reaktionsbedingungen mit Maleimido-BTI zur Reaktion gebracht, um eine möglichst hohe Ausbeute an Lhcb-1-BTI zu erhalten. Variiert wurden die Detergensusumgebung, die Reaktionszeit, Farbstoffüberschuß, Reaktionstemperatur sowie die Probenvorbereitung vor einem Gellauf. Die Effizienz der Markierungsausbeute konnte in gleicher Weise wie bei allen anderen Markierungen mittels eines analytischen SDS-Polyacrylamidgels bestimmt werden. Im Gegensatz zum Lhcb-1-Cy5.5, Lhcb-1-NIR-Cy oder Lhcb-1-IRD38 migrierte Lhcb-1-BTI schneller durch das analytische Gel als das unmarkierte Protein. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre eine bevorzugte Anlagerung von SDS-Molekülen an den sehr hydrophoben Farbstoff, so daß die Menge negativer Ladungen pro Protein erhöht wäre. Eine schnelle Migration wäre dann nicht durch das erhöhte Molekulargewicht bestimmt, sondern über die erhöhte negative Ladungsdichte.

Abb. 4.17 analytisches Polyacrylamid-Gel eines Lhcb-1-Markierungsansatzes mit Maleimido-BTI



Lhcb-1 des Klons S3C wurde mit Maleimido-BTI in 25,5-fachem molarem Überschuß zur Reaktion gebracht. Dazu wurden Proteinmengen von 5 - 10 µg in unterschiedlicher Detergensusumgebung mit dem in THF gelösten Farbstoff auf dem Vortexer gemischt (10 nmol Maleimido-BTI pro 1,5 µl THF) und nachfolgend mehrere Stunden bei 37°C inkubiert. Ein pH-Wert von 7,0 wurde mit 20 mM NaP eingestellt. In jede Geltasche wurde nach Beendigung der Reaktion 2,5 µg Lhcb-1 pipettiert. Folgende Bedingungen wurden in den Reaktionen eingestellt:

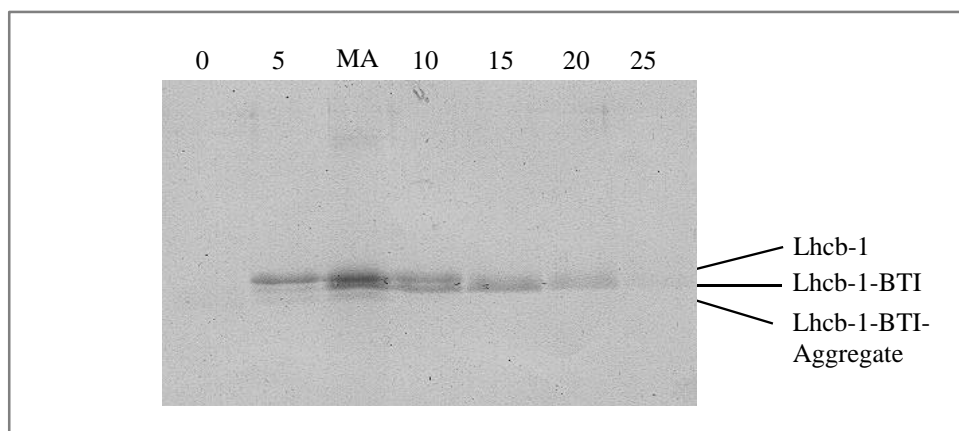
Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SDS-Gehalt [%]	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,5	0,1	0,1	1	1
OG-Gehalt [%]	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-
Reaktionszeit [h]	2	2	6	6	2	2	2	2	2	2
1' 100°C nach Reaktion + Ultraschall	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

Wie dem Gel in Abb. 4.17 zu entnehmen, war eine Detergensumgebung von 1% OG und 0,1% SDS optimal (Bahn 7 und 8). Eine Reaktionszeit von 6 h erhöhte dabei nur geringfügig die Markierungsausbeute. Eine Hitzedenaturierung des Markierungsansatzes erwies sich als notwendig, da sonst viel Protein durch Aggregation verloren ging. Zu sehen ist dies in Abb. 4.17 im Übergang zwischen Sammel- und Trenngel in Bahn 1, 3 und 7.

Weitere Versuche (nicht dargestellt) zeigten, daß eine Reaktionstemperatur von 37°C die Markierungsausbeute gegenüber Raumtemperaturbedingungen erhöhte. Ein Farbstoffüberschuß von 12,5-fach molar erwies sich überdies als ausreichend, um einen Markierungsgrad von ca. 50% zu erhalten (Abschätzung aus analytischem Polyacrylamidgel). Markierungsausbeuten von 80% und mehr, wie sie mit anderen Maleimidofarbstoffen möglich sind (vgl. Huschenbett, 2001), konnten in keinem Fall erreicht werden. Dies rührte wahrscheinlich daher, daß in der Maleimido-BTI-Probe noch eines der Eddukte, Maleimidobuttersäure, vorlag, welches auch mit Mercaptogruppen reagierte.

Eine Abtrennung des Lhcb-1-BTI vom unmarkierten Protein gelang mittels präparativer Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 3.1.3.2). Interessanter Weise verließ hier das unmarkierte Protein zuerst die Gelmatrix, Lhcb-1-BTI konnte nachfolgend rein eluiert werden. Eine weitere Lhcb-1/Maleimido-BTI-haltige Bande schnellerer Migrationsgeschwindigkeit konnte ebenfalls abgetrennt werden. Vermutlich handelte es sich hierbei um Protein-Maleimido-BTI-Aggregate (möglicherweise lagerte sich hier ein zweiter Farbstoff vermittelt durch den ersten an das Lhcb-1 an).

Abb. 4.18: analytisches Gel einiger Fraktionen der präparativen Gelelektrophorese des Lhcb-1-BTI-Markierungsansatzes



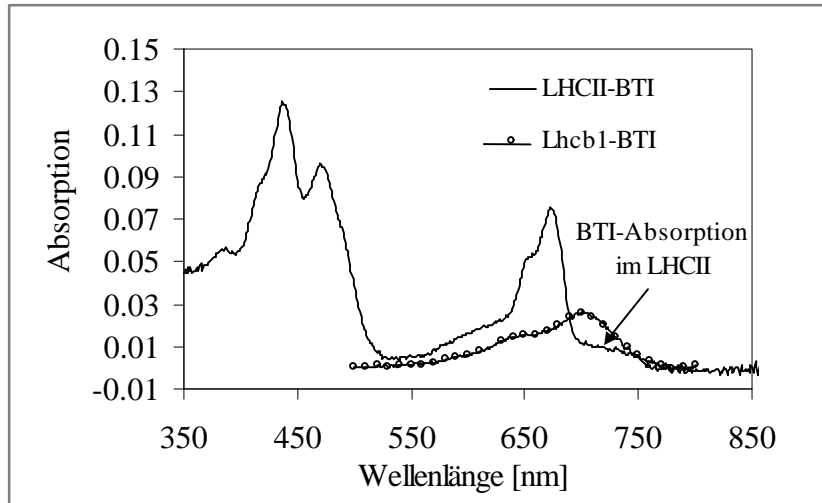
100 µg eines Standardmarkierungsansatzes von S3C (Kapitel 3.1.2.4) wurde über eine präparative Gelelektrophorese aufgereinigt (Prozedur vgl. Kapitel 3.1.3.2). Nachfolgend wurden die 120 µl-Eluatfraktionen photometrisch auf den Maleimido-BTI-Gehalt hin untersucht und 50 µl jeder fünften farbstoffhaltigen Fraktion aufkonzentriert. In einem analytischen Polyacrylamidgel wurden dann die Proben mit reinem Lhcb-1-BTI detektiert. Die Bahnen 1, 2, 4-7 zeigen ausgewählte Fraktionen (0-25) der präparativen Gelelektrophorese. Ab Fraktion 15 wurde von aufgereinigtem Lhcb-1-BTI ausgegangen. Die Bahn „MA“ zeigt den aufzutrennenden Markierungsansatz vor der präparativen Gelelektrophorese.

Überprüfung der Selektivität der Maleimido-BTI-Kopplung im LHCII

Schon nach der präparativen Gelelektrophorese konnte im analytischen Gel gezeigt werden, daß pro Lhcb-1 mit großer Wahrscheinlichkeit nur ein Maleimido-BTI-Molekül gebunden vorlag. Unmarkiertes Protein sowie ungekoppelter Farbstoff sollten abgetrennt sein. In zwei weiteren Schritten wurde diese Annahme manifestiert, sowie die N-terminale Lage der Farbstoffmarkierung verifiziert.

Maleimido-BTI-Lhcb-1 wurde dazu nach der präparativen Gelelektrophorese nach Kapitel 3.1.3.2 aufkonzentriert, rekonstituiert und nachfolgend über eine Dichtegradientenzentrifugation von ungefaltetem Protein und freiem Chlorophyll gereinigt (vgl. Kapitel 4.2.1). Die LHCII-BTI-Komplexe wurden anschließend photometrisch charakterisiert.

Abb. 4.19: Absorption von LHCII-BTI



LHCII-BTI wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und nachfolgend photometrisch charakterisiert. Um die Maleimido-BTI-Absorption besser detektieren zu können, wurde die Absorption von unpigmentiertem Lhcb-1-BTI als Vergleich (jedoch in einer größeren Konzentration als die der LHCII-Komplexe) dargestellt.

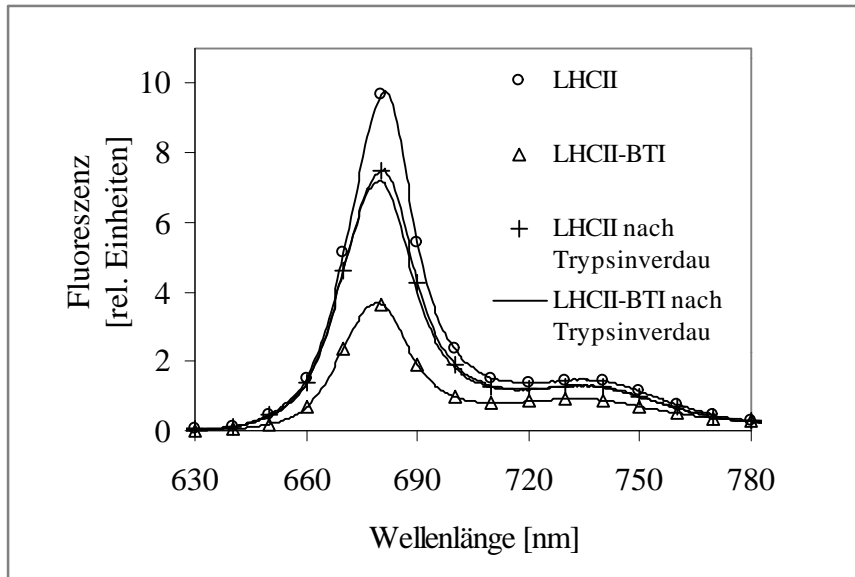
Aus dem Absorptionsspektrum konnte der LHCII- und Maleimido-BTI-Gehalt bestimmt und damit gezeigt werden, daß LHCII und Maleimido-BTI in äquimolarem Verhältnis zueinander vorliegen.

$$\frac{E_{\text{LHCII - BTI}} 670 \text{ nm} / 546.000}{E_{\text{LHCII - BTI}} 701 \text{ nm} / 85.000} = 0,99$$

E = Extinktion, $\epsilon_{\text{LHCI}} = 546.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{Maleimido-BTI}} = 85.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (vgl. Kapitel 4.1.1 und 4.1.3)

Darüber hinaus wurden die aufgereinigten Komplexe fluorometrisch charakterisiert (vgl. dazu Kapitel 4.2.4.3) und der Energietransfer über die Verminderung der Chla-Quantenausbeute bei Energietransfer auf den Akzeptor quantifiziert. Im Anschluß daran wurden LHCII und LHCII-BTI tryptisch verdaut (vgl. Kapitel 3.2.6). Es sollte überprüft werden, ob nach N-terminalem Proteinverdau der Energietransfer auf Maleimido-BTI erlischt, wie es bei einer selektiven N-proximalen Bindung des Farbstoffs (3.AS, vgl. Kapitel 2.3) zu erwarten wäre.

Abb. 4.20: Löschen der Chla-Fluoreszenz in Anwesenheit von Maleimido-BTI in LHCII-BTI sowie Trypsinverdau der Komplexe



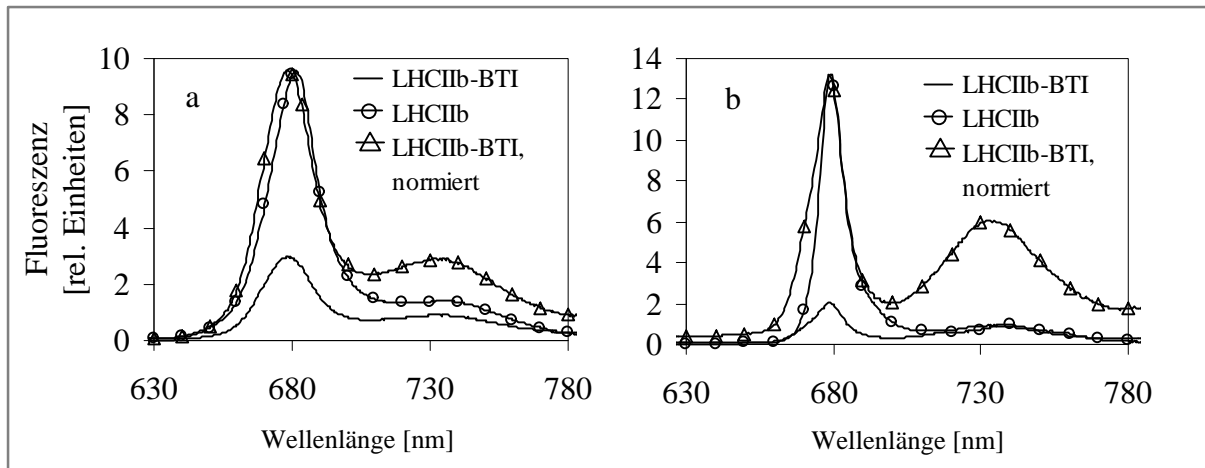
LHCII und LHCII-BTI wurden auf gleiche Chla-Absorption bei 410 nm normiert. Fluoreszenzemissionsspektren wurden nach selektiver Chla-Anregung bei 410 nm gemessen. Die LHCII-BTI-Probe enthielt in diesem Experiment noch unmarkiertes Protein, daher war das Donorquenching nicht maximal. Um die Komplexe N-terminal zu verdauen, wurden 200 μ l der LHCII- bzw. LHCII-BTI-Komplexe 30 min bei Raumtemperatur mit 0,1 mg/ml Trypsin in Tricinepuffer inkubiert (vgl. Kapitel 3.2.6) und anschließend in gleicher Weise erneut fluorometrisch charakterisiert.

Durch den Trypsinverdau verringerte sich in LHCII die Chla-Fluoreszenz (vgl. Trypsinverdau in Kapitel 4.2.3). Nichtsdestotrotz bewirkte der Proteaseverdau in den LHCII-BTI-Komplexen einen Anstieg der Chlorophyllfluoreszenz auf das Chla-Emissionsmaximum der unmarkierten LHCII-Komplexe. Damit konnte gezeigt werden, daß der Energietransfer auf Maleimido-BTI spezifisch innerhalb eines Komplexes stattfand und darüber hinaus der Farbstoff an der gewünschten Stelle am N-terminus vorlag.

4.2.4.3 Energietransfer von Chla auf Maleimido-BTI in LHCII-Komplexen

Der Energietransfer von Chla auf Maleimido-BTI in LHCII-BTI wurde nach Kapitel 3.3.1 über das Donorquenching bei 297K und 77K bestimmt.

Abb. 4.21: Löschung der Chla-Fluoreszenz in LHCII-BTI bei 297K (a) und 77K (b)



Lhcb-1 sowie Lhcb-1-BTI wurden rekonstituiert und über eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Die gefalteten Komplexe wurden photometrisch auf gleiche Chlorophyllabsorption in der Soretbande eingestellt und nachfolgend Emissionsspektren nach selektiver Chla-Anregung bei 410 nm gemessen (vgl. Kapitel 3.2.5). Die Messungen fanden bei 297K und 77K statt. Für die Tieftemperaturmessungen wurden die Proben auf einen Glyceringehalt von 60% eingestellt. Um die Maleimido-BTI-Emission in LHCII-BTI-Komplexen zu detektieren, wurde das LHCII-BTI-Emissionsspektrum zusätzlich auf die maximale Chla-Fluoreszenz in LHCII normiert.

In zwei unabhängigen Messungen wurden die in Tabelle 4.9 dargestellten Energietransfereffizienzen ermittelt.

Tabelle 4.9: Energietransfer von Chla auf Maleimido-BTI in LHCII-BTI-Komplexen, bestimmt über das Donorquenching bei einer Wellenlänge

Versuch	Energietransfer bei 297 K	Energietransfer bei 77 K
	[%]	[%]
1	69	85
2	72	84

Der Energietransfer von Chla auf Maleimido-BTI wurde nach Excitation bei 410 nm gemessen (vgl. Kapitel 3.3.1). Die Quantifizierung des Energietransfers erfolgte über die Abnahme der maximalen Chla-Fluoreszenz einer Wellenlänge. Eine Quantifizierung über den Vergleich der gesamten Chlorophyllintegrale war aufgrund einer peripheren Überlappung der Chlorophyll- mit der Maleimido-BTI-Fluoreszenz nicht möglich.

Der Energietransfer wurde über das Donorquenching bestimmt. Das Quenching mußte über die Abnahme der maximalen Chla-Fluoreszenz einer Wellenlänge bestimmt werden, da eine periphere Überlappung der Chla-Fluoreszenz mit der Maleimido-BTI-Fluoreszenz bestand. Dekonvolutionsberechnungen zeigten für 297K-Messungen, daß sich der Kurvenverlauf im Bereich von 650-680 nm bei Anwesenheit des Quenchers kaum veränderte, so daß ein Fehlerniveau von 2% nicht überschritten wurde. Es wurde auch exemplarisch der Energietransfer über die stimulierte Akzeptorfluoreszenz bestimmt. Dazu mußte das LHCII-BTI-Emissionsspektrum nach Kapitel 3.3.1 in die beiden Unterspektren dekonvolutiert werden. Diese Dekonvolution erreichte nur einen Anpassungsgrad von 93% (nicht dargestellt). Nichts desto trotz erfolgte die Berechnung des Energietransfers in gleicher Weise wie für die LHCII-Cy5.5-Konstrukte (vgl. Kapitel 3.3.2). Die Energietransfereffizienz betrug hier 65% und war damit in der selben Größenordnung wie die Transferfizzienzwerte aus Tabelle 4.9.

Bei den 77K-Messungen änderte sich im Gegensatz zu den 297K-Versuchen das Chla-Emissionsspektrum durch den Energietransfer auf Maleimido-BTI deutlich (vgl. Abb. 4.21b). Im Bereich von 650 - 680 nm trat durch Anwesenheit des Quenchers eine Vergrößerung der Halbwertsbreite in der Chlorophyllfluoreszenz auf. Berücksichtigt man diese und bestimmt den Energietransfer über den Vergleich der Integrale mit den Integrationsgrenzen 650 nm und 680 nm, erhält man die in Tabelle 4.10 dargestellten Transferdaten.

Tabelle 4:10: Energietransfer von Chla nach Maleimido-BTI in LHCII-BTI-Komplexen, bestimmt über das Donorquenching bei Vergleich der Fluoreszenzintegrale mit den Integrationsgrenzen 650 nm und 680 nm

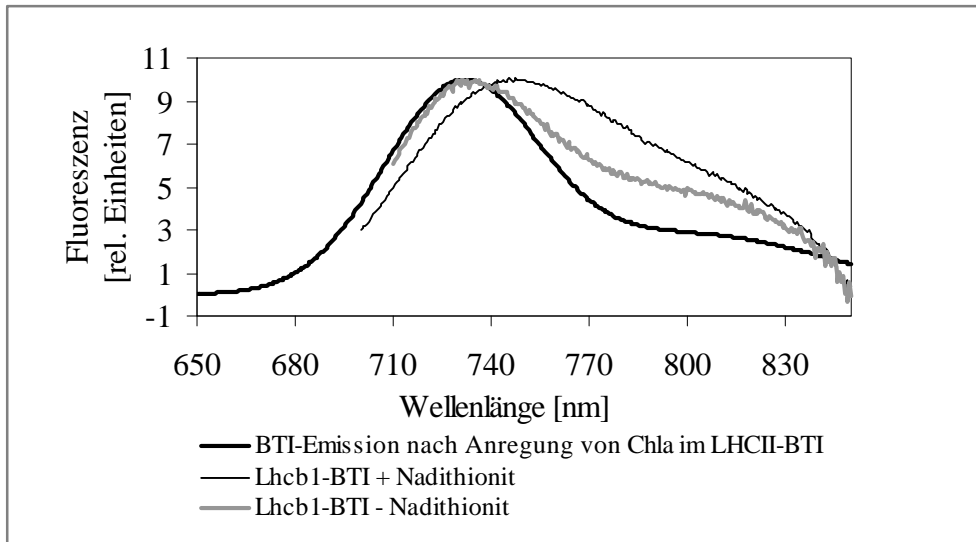
Versuch	Energietransfer bei 77K [%]
1	77
2	75

Der Energietransfer von Chla auf Maleimido-BTI wurde nach Excitation bei 410 nm gemessen (vgl. Kapitel 3.2.5). Die Quantifizierung des Energietransfers erfolgte mittels Donorquenching. Dazu wurde von LHCII und LHCII-BTI das Integral von 650 nm bis zur Wellenlänge der maximalen Chla-Fluoreszenz (677,5 nm für LHCII-BTI und 679 nm für LHCII) zur Berechnung herangezogen.

Energietransfer versus Elektronentransfer von Chla auf Maleimido-BTI

Um zu belegen, daß die Maleimido-BTI-Fluoreszenz wirklich einem Energie- und keinem Elektronentransfer von Chla entstammte, wurde die Farbstoff-Emission im biomimetischen Modell näher untersucht. Da reduziertes Maleimido-BTI eine Verschiebung des Emissionsmaximums zeigte (vgl. Kapitel 4.1.4), wurde untersucht, ob die Maleimid-BTI-Emission im LHCII-Komplex eher dem reduzierten oder dem nicht reduzierten Farbstoffspektrum entspricht.

Abb. 4.22: Fluoreszenz von Maleimido-BTI im oxidierten und reduzierten Zustand sowie gekoppelt an LHCII



Lhcb-1-BTI (in 0,1% SDS, 50 mM Tris, 384 mM Glycin und 1 mM EDTA) wurde bei 698 nm angeregt und das Emissionsspektrum gemessen. Im Anschluß wurde eine Spatelspitze Na-Dithionit zur Protein-Farbstofflösung gegeben und der Versuch unter Anregung bei 691 nm wiederholt.

Um die Lhcb-1-BTI-Fluoreszenz mit der Farbstofffluoreszenz in LHCII-BTI nach Chla-Anregung vergleichen zu können, wurde das Emissionsspektrum eines LHCII-BTI-Komplexes in die Chlorophyll- und Maleimido-BTI-Fluoreszenz mittels zweier Gauß/Lorentz-Mischfunktionen zerlegt.

Nach Abb. 4.22 zeigt die Maleimid-BTI-Fluoreszenz im LHCII-Komplex eine deutliche Übereinstimmung mit der Farbstoffemission von Lhcb-1-BTI im nicht reduzierten Zustand. Damit wurden starke Hinweise für einen Energietransfer von Chla auf den Farbstoffe und gegen einen Elektronentransfer gefunden.

Eine Verschleierung des Elektronentransfers von Chla auf Maleimido-BTI durch eine nachfolgende Elektronenabgabe des Farbstoffs an den Sauerstoff konnte zwar nicht ausgeschlossen werden. Hinweise darauf konnten jedoch nicht gefunden werden (vgl. Kapitel 4.1.4).

Erhöhung der Maleimido-BTI-Fluoreszenz in den LHCII-BTI-Konstrukten durch Variation der Detergenumgebung

Nachdem in Kapitel 4.1.2 eine Erhöhung der Maleimido-BTI-Quantenausbeute durch Variation des wäßrigen Mediums erreicht werden konnte, sollten diese Erkenntnisse auch auf das LHCII-BTI-Konstrukt angewendet werden. Es wurde dazu LHCII-BTI in ein Medium mit 1% LM und 1,5 µg/µl Phosphatidylglycerol gebracht und fluorometrisch charakterisiert.

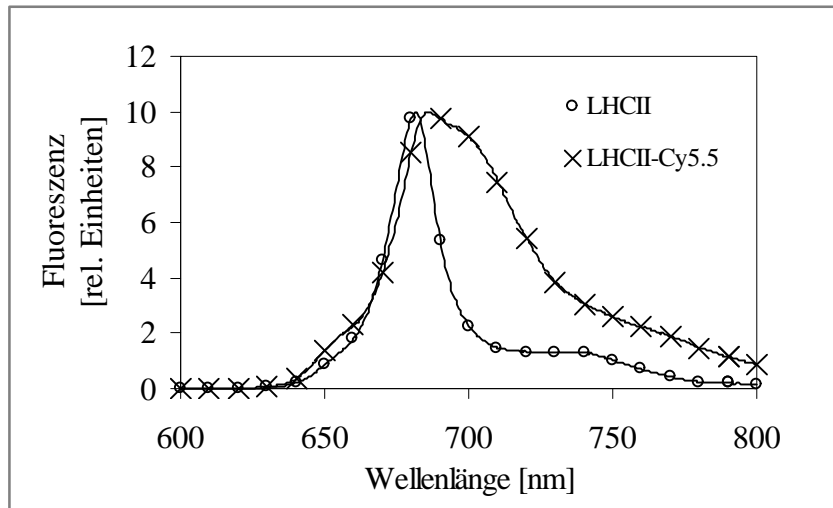
Es konnte jedoch keine Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute des Farbstoffs detektiert werden.

4.2.5 Stabilität der LHCII-Farbstoff-Konstrukte

Die Intaktheit der biomimetischen Modelle wurde über den komplexinternen Energietransfer von Chlb nach Chlb a überprüft. In jedem Fall konnte ein effizienter Energietransfer detektiert werden.

Trotzdem wurde in LHCII-Energiefallen-Konstrukten nach Chlb-Anregung eine kleine Schulter der Chlb-Emission detektiert, die größer aussah als im gemessenen Referenzspektrum von farbstofffreiem LHCII (vgl. Abb. 4.23). Die Hauptursache für diese scheinbar Chlb-Fluoreszenzerhöhung in den LHCII-Farbstoff-Komplexen lag in der Normierung der Spektren auf die maximale Chlorophyllfluoreszenz. Zwar wurden in den Experimenten LHCII-Farbstoff-Komplexe und LHCII-Komplexe auf gleiche Chlorophyllabsorption eingestellt, doch war die Chla-Fluoreszenzquantenausbeute in LHCII-Farbstoff-Komplexen deutlich verringert aufgrund des Energietransfers auf den Energieakzeptor. Es verblieb eine verminderte Chla-Fluoreszenz und eine gegenüber dem farbstofffreien LHCII vermutlich wenig veränderte Chlb-Fluoreszenz.

Abb. 4.23: Energietransfer von Chlb nach Chla in LHCII und LHCII-Cy5.5



LHCII und LHCII-Cy5.5 aus einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation wurden bei 460 nm angeregt und ein Emissionsspektrum gemessen. Beide Emissionsspektren wurden auf die maximale Chla-Fluoreszenz normiert.

Nichts desto trotz kam es in einigen Fällen auch zu einem absoluten Anstieg der Chlb-Fluoreszenz in den LHCII-Farbstoff-Konstrukten, was auf eine partielle Unstrukturiertheit der Probe hindeutete. Es konnte aber in keinem Fall ein schnellerer Zerfall der betreffenden Komplexe gegenüber farbstofffreiem LHCII detektiert werden.

5. Einzelmolekülspektroskopie an orientiert immobilisiertem LHCII

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit lag in einer näheren Charakterisierung des komplexinternen Energietransfers von LHCII. Dazu sollten die Komplexe auf einer Glasoberfläche immobilisiert und dann ihr Fluoreszenzverhalten einzelmolekular analysiert werden.

5.1 Selektive Immobilisation von LHCII-His6 an HRP

Ziel der Versuche zur Immobilisation von LHCII-His6 an Glasoberflächen war es, den Komplex spezifisch über den „His6-tag“ zu binden und damit auf der Oberfläche in eine definierte Orientierung zu bringen. Unspezifische Interaktionen vom Protein mit dem beschichteten Glas sollten so stark wie möglich minimiert werden.

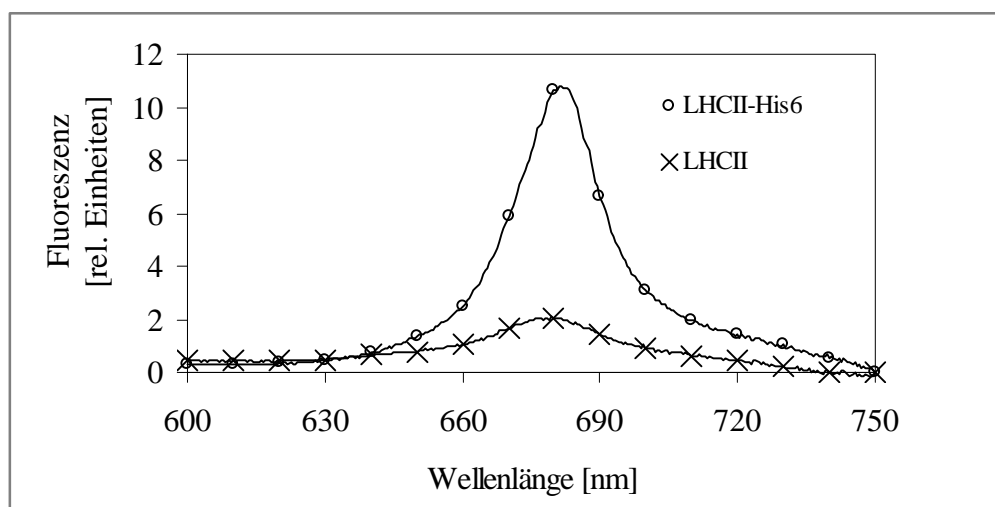
Als geeignete Oberflächenbeschichtung stellte sich eine Meerrettich-Peroxidase (HRP) mit Ni-NTA als Proteinanker heraus. Wie von Noji *et al.* (1997) beschrieben, immobilisiert HRP spontan an Glasoberflächen (vgl. Kapitel 1.4.1) und präsentiert seine Ni-NTA-Gruppe zur Proteinbindung.

Es wurden in Populationsmessungen am Fluoromax-2 und in einzelmolekularen Meßanordnungen die Spezifität einer solchen LHCII-Bindung an HRP-beschichtete Glasoberflächen überprüft. Dazu wurden gleiche LHCII-Mengen der Mutanten S3Ch (mit „His6-tag“) und D7f.3 (Wildtypprotein) auf einer HRP-beschichteten Oberfläche inkubiert und anschließend die Bindungseffizienz der Komplexe bei An- und Abwesenheit des „His6-tag“ am Protein bestimmt (vgl. Kapitel 3.4).

5.1.1 Populationsmessungen am Fluoromax-2

In zwei Versuchen mit LHCII-Monomeren der Mutanten D7f.3 und S3Ch konnte eine deutlich größere Bindungsaffinität des LHCII mit „His6-tag“ gegenüber dem Wildtypprotein gezeigt werden. Je nach Konzentration der zur Immobilisation eingesetzten LHCII-Lösung war die Proteinbindung ca. 3 - 4-fach erhöht (vgl. Tabelle 5.1 und Abb. 5.1). Bestimmt wurde die unterschiedliche Bindungseffizienz über die Chlorophyllfluoreszenz der beschichteten Glasplatten in der Front-face-Apparatur des Fluoromax-2. Dazu wurde komplexgebundenes Chla in der Soretbande angeregt und die Gesamtemission detektiert. Die Fluoreszenzquantifizierung, wie sie auch in Tabelle 5.1 angegeben ist, stellte nur einen Näherungswert dar, da mit Hilfe der „Front-face“-Apparatur generell keine genaue Kalkulation von Fluoreszenzen möglich ist (vgl. Reinsberg, 2000). Die auf diese Weise detektierte Emission ist nicht linear proportional zur Chromophorkonzentration der Probe.

Abb. 5.1: Emission von an HRP immobilisiertem LHCII und LHCII-His6



Gleiche Mengen LHCII und LHCII-His6 wurden nach Kapitel 3.4.1 auf einer mit HRP-beschichteten Glasplatte inkubiert. Um die relative Menge an gebundenem Komplex bestimmen zu können, wurde die beschichtete Glasplatte mit der „Front-face“-Technik im Fluorometer charakterisiert. Hier dargestellt ist die Chla-Emission nach selektiver Chla-Excitation bei 410 nm. Fluorometrische Meßparameter (abweichend von Kapitel 3.2.5) waren eine Integrationszeit von 0,5 sec und eine Spaltbreite für Excitation und Emission von 5 nm.

Tabelle 5.1: Vergleich der Bindungseffizienz von LHCII und LHCII-His6 auf HRP-beschichteten Glasplatten

	LHCII-His6 : LHCII
Versuch 1 (LHCII-Konzentration 0,8 μM)	$\sim 3,8 : 1$
Versuch 2 (LHCII-Konzentration 0,2 μM)	$\sim 2,6 : 1$

LHCII der Mutanten D7f.3 und S3Ch wurden auf gleiche Komplexkonzentration normiert und nach Kapitel 3.4.1 auf HRP-beschichteten Glasplatten immobilisiert. Eine Quantifizierung der Bindungseffizienz beider Mutanten erfolgte in der „Front-face“-Apparatur des Fluoromax-2 nach Chla-Excitation bei 410 nm. Die Integrale der Chlorophyllfluoreszenzen wurden bestimmt und zueinander ins Verhältnis gesetzt (die Integrationsgrenzen lagen bei 600 nm und 750 nm).

Eine Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenz nach Chlb-Excitation bei 460 nm wies zudem auf eine hohe Effizienz des komplexinternen Energietransfers hin. Es konnte weitestgehend nur Chla-Fluoreszenz detektiert werden.

Eine Zerstörung dieses Energietransfers wurde durch eine längere Lagerung der immobilisierten Komplexe erreicht. Nach 2 Tagen Inkubation auf Eis konnte bei gleichen Meßparametern vorwiegend eine Chlb-Emission detektiert werden (nicht dargestellt). Diese Beobachtungen waren ein guter Hinweis darauf, daß es sich bei den gebundenen Proteinen zuvor um intakte LHCII-Komplexe gehandelt hatte.

Interessanter Weise war im Fall der Mutante S3Ch nicht nur die Bindungseffizienz durch den „His6-tag“ erhöht, die Komplexe dieses Proteins zeigten auch bei der Lagerung im immobilisierten Zustand eine erhöhte Stabilität. Während nach 2 Tagen Inkubation beider Mutanten (in Abwesenheit eines Flüssigkeitsfilms auf Eis) kein komplexinterner Energietransfer mehr

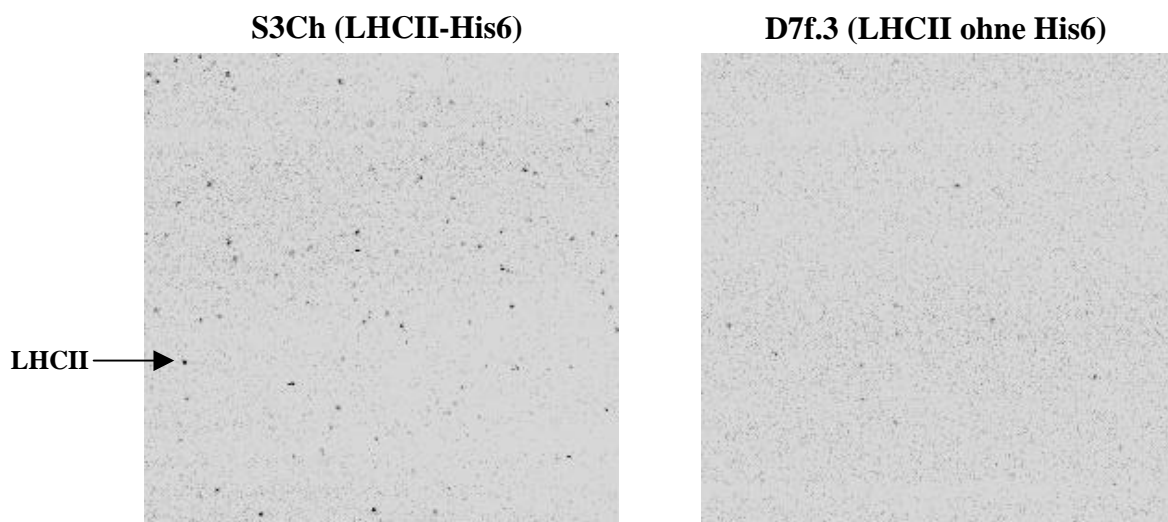
detektiert werden konnte, war ein solcher nach eintägiger Lagerung bei der S3Ch-Mutante noch feststellbar. LHCII des Wildtypproteins war zu diesem Zeitpunkt schon denaturiert.

5.1.2 Einzelmolekülspektroskopie zur Bestimmung der Bindungsselektivität von LHCII-His6

Nachdem in Messungen an D7f.3- und S3Ch-Monomerkomplexen am Fluoromax-2 (Kapitel 5.1.1) eine deutlich erhöhte Bindung von LHCII-His6 gegenüber LHCII ohne „His6-tag“ gezeigt werden konnte, wurde auf der Ebene der Einzelmolekülspektroskopie versucht, eine möglichst ausschließliche Bindung von LHCII-His6 zu erreichen. Alle spektroskopischen Versuche zur Einzelmolekülspektroskopie fanden in der AG Wrachtrup (3. Physikalisches Institut der Universität Stuttgart) statt und wurden von den Mitgliedern der dortigen Arbeitsgruppe durchgeführt.

Es wurden Versuche mit verschiedenen Konzentrationen und unterschiedlichen Inkubationszeiten des LHCII/LHCII-His6 auf der HRP-beschichteten Oberfläche durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß sowohl die Konzentration der Komplexe als auch die Inkubationsdauer die Selektivität der Bindung entscheidend beeinflussten. Nur bei Komplexkonzentrationen im Bereich von 1 - 5 pM und einer Inkubationszeit von maximal einer Minute konnte eine nahezu ausschließliche Bindung von LHCII-His6 und damit der Mutante S3Ch nachgewiesen werden (vgl. Abb. 5.2). Erhöhte Bindungszeiten oder größere Proteinmengen führten auch zur Immobilisation von LHCII ohne His6-tag. LHCII-His6 wurde in diesem Fall so stark gebunden, daß im Lichtfokus eines Durchmessers von 300 nm (Auflösungsgrenze der Messung, vgl. Kapitel 3.5.1) nicht mehr von der Detektion einzelner Komplexe ausgegangen werden konnte.

Abb. 5.2: LHCII-Emission in HRP-beschichteten Flüssigkeitszellen



LHCII-Monomere der Mutanten D7f.3 und S3Ch wurden in einer Konzentration von 4 pM auf einer HRP-beschichteten Glasplatte nach Kapitel 3.4.2 immobilisiert und anschließend nach Kapitel 3.5.1 einzelmolekular vermessen. Gezeigt ist eine Momentaufnahme der LHCII-Fluoreszenz. Jeder schwarze Punkt zeigt die Fluoreszenz eines singulären LHCII-Komplexes nach Anregung bei 650nm. Kleinere graue Punkte stellen das Hintergrundrauschen dar.

Damit lag die verwendete LHCII-Konzentration in der gleichen Größenordnung wie die des LH2 zur Immobilisation auf Glimmer. Bopp *et al.* (1997) beschrieb hier eine orientierte Bindung der Komplexe aufgrund elektrostatischer Anziehungskräfte und erreichte einen ausreichenden Abstand zwischen den einzelnen Komplexen bei Verwendung einer 2 pM LH2-Lösung.

Eine ähnlich selektive Immobilisation wie mit den Monomerkomplexen konnte mit LHCII-Trimeren der Mutante S3Ch im Vergleich zu nativen Trimeren erzielt werden. Auch hier banden die nativen Komplexe deutlich geringer (um den Faktor 5) als die rekonstituierten LHCII-His6-Mutanten.

HRP zeigte insgesamt bei allen Untersuchungen eine geringe Eigenfluoreszenz, das Hintergrundrauschen der spektroskopischen Messungen war um den Faktor 10 geringer als die eigentliche LHCII-Fluoreszenz.

5.2 Einzelmolekülspektroskopische Versuche zum komplexinternen Energietransfer

5.2.1 Fluoreszenzpolarisationsmessungen am Monomer und Trimer

LHCII-Monomere und -Trimere der Mutante S3Ch wurden auf HRP-beschichteten Deckgläsern über den „His6-tag“ immobilisiert (vgl. Kapitel 3.4.2) und anschließend in der detergentenhaltigen Lösung einer Flüssigkeitszelle einzelmolekular untersucht.

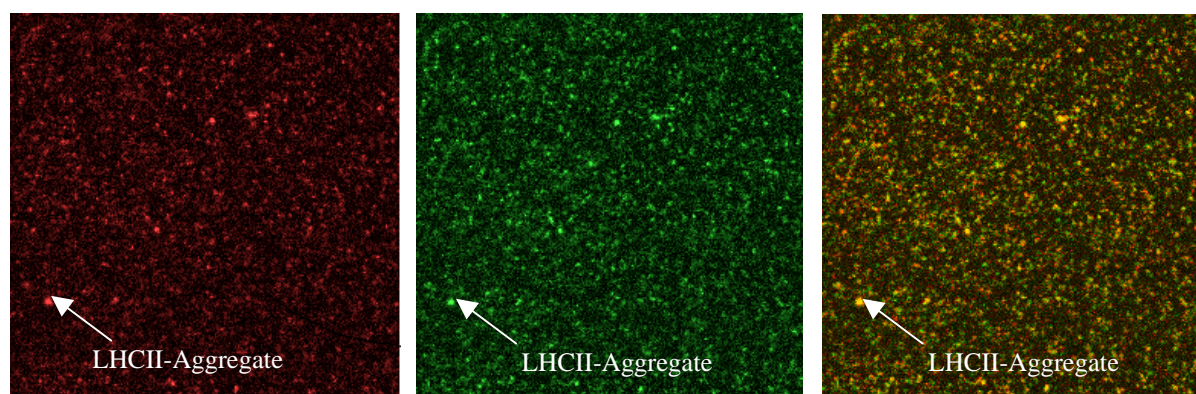
Um den minimalen Polarisationsgrad der zu untersuchenden Komplexe festzustellen, wurde an einzelnen LHCII-Molekülen die Fluoreszenzveränderung über die Zeit ermittelt (vgl. Kapitel 3.5.2). Nach Excitation von Chlb wurde die auftretende Chlorophyllfluoreszenz zweier orthogonaler Polarisationsrichtungen detektiert und quantifiziert. Für LHCII-Monomere und -Trimere wurden unterschiedliche minimale Polarisationsgrade nachgewiesen.

Monomere

In früheren Versuchen mit LHCII-Monomeren, eingebettet in PVA, wurde bereits der Polarisationsgrad der Chlorophyllfluoreszenz bestimmt (Tietz *et al.*; 2001). Mit Hilfe eines rotierenden Polarisators, positioniert vor der Photodiode, konnte aus der Modulationstiefe ein Polarisationsgrad von nahezu 1 abgelesen werden.

In den Versuchen dieser Arbeit gelang auch an HRP-immobilisierten LHCII-Monomeren der Nachweis linearer Polarisation in der auftretenden Chlorophyllfluoreszenz. Die Momentaufnahmen der LHCII-Fluoreszenz (vgl. Kapitel 3.5.1) verdeutlichen dieses Phänomen. In Abb. 5.3 sind die konfokalen Fluoreszenzbilder zweier orthogonaler Polarisationsrichtungen dargestellt sowie die Überlagerung aus den beiden Bildern.

Abb. 5.3: Detektion der Emission zweier Polarisationsrichtungen von LHCII-Monomeren in HRP-beschichteten Flüssigkeitszellen



LHCII-Monomere der Mutante S3Ch wurden nach Kapitel 3.4.2 auf einem HRP-beschichteten Deckglas immobilisiert. Hier dargestellt sind drei konfokale Fluoreszenzbilder einzelner LHCII-Komplexe (vgl. Kapitel 3.5.1). Im linken und mittleren Bild sind Emissionsdetektionen zweier orthogonaler Polarisationsrichtungen in den Farben rot und grün aufgezeichnet. Das rechte Bild stellt eine Überlagerung der beiden anderen Bilder da. Erscheint hier ein Bildpunkt orange, weist dies auf eine Fluoreszenzdetektion beider Polarisationsrichtungen (Überlagerung des roten und grünen Bildpunkts) hin.

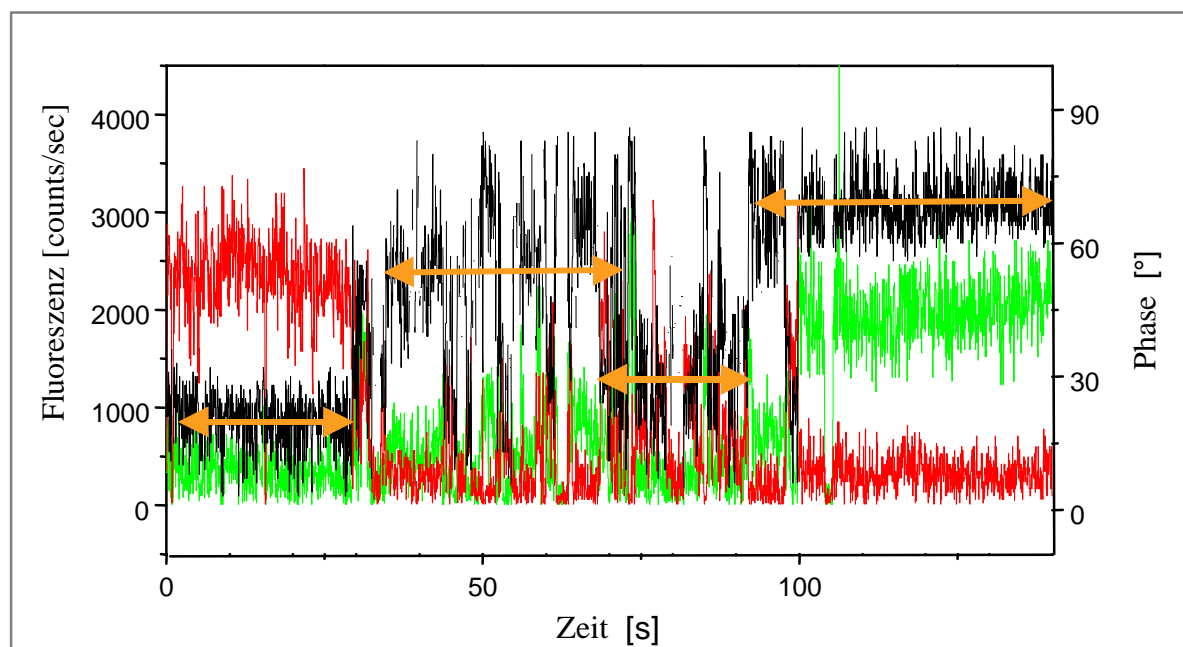
Die in Abb. 5.3 auftretende Fluoreszenz beider Polarisationsrichtungen zeigte für die LHCII-Komplexe eine Verteilung identisch derer einzelner emittierender Dipole (wie z.B. von einzelnen Farbstoffmolekülen). So konnte für viele Monomere nur Fluoreszenz einer Polarisationsrichtung gemessen werden. Dies war immer dann der Fall, wenn der Dipol des emittierenden Chl_a parallel zu einem der beiden detektierten Polarisationsrichtungen lag. In Abb. 5.3 sind dies die Fälle, in denen in der Bildüberlagerung (rechtes Bild) die Fluoreszenz als roter oder grüner Bildpunkt dargestellt ist.

Daneben existierten eine Reihe von Komplexen mit Fluoreszenzdetektion in beiden Polarisationsrichtungen (orange Bildpunkte durch Rot-Grün-Überlagerung). Dies geschah, wenn das Dipolmoment des Fluorophors in einem Winkel zwischen den beiden orthogonalen Polarisationsrichtungen lag, oder aber sich hinter den einzelnen Fluoreszenzpunkten Aggregate von LHCII-Komplexen verbargen (auch durch eine deutlich intensivere Fluoreszenz in Abb. 5.3 erkennbar).

Eine Unterscheidung zwischen linearer Polarisiertheit in einem Winkel zwischen 0° und 90° zu den detektierten Polarisationsrichtungen und einer Depolarisation konnte in dieser Meßanordnung nur über eine Vielzahl gemessener Komplexe erfolgen. Es wurde dazu der minimale Polarisationsgrad nach Kapitel 3.5.2 aus den Zeitspuren der LHCII-Emission bestimmt (vgl. Abb. 5.4) und ähnlich den Ergebnissen von Tietz *et al.* (2001) ein Polarisationsgrad nahe eins für die zu Grunde liegende LHCII-Population bestimmt.

In den Zeitspuren der LHCII-Emission kam es im Verlauf von Sekunden in der Hälfte aller vermessenen Monomere zur Änderung der Polarisationsrichtung des emittierten Lichts.

Abb. 5.4: Phasensprünge in der Fluoreszenz von LHCII-Monomeren der Mutante S3Ch



LHCII-Monomere der Mutante S3Ch wurden nach Kapitel 3.4.2 auf einer HRP-beschichteten Oberfläche immobilisiert. Im folgenden wurde ein einzelner Komplex mit zirkular polarisiertem Licht einer Wellenlänge von 650 nm bestrahlt und das Fluoreszenzlicht zweier orthogonaler linearer Polarisationsrichtungen detektiert. Die grüne und die rote Kurve spiegelt die Fluoreszenzintensität beider Polarisationsrichtungen wieder. Die schwarze Kurve gibt den Phasenwinkel der Gesamtfluoreszenz an und errechnet sich aus dem jeweiligen Fluoreszenzanteil beider Polarisationsrichtungen (als 0° und 90° festgelegt). Die orangenen Pfeile geben den durchschnittlichen Phasenwinkel zwischen zwei Polarisations sprüngen an.

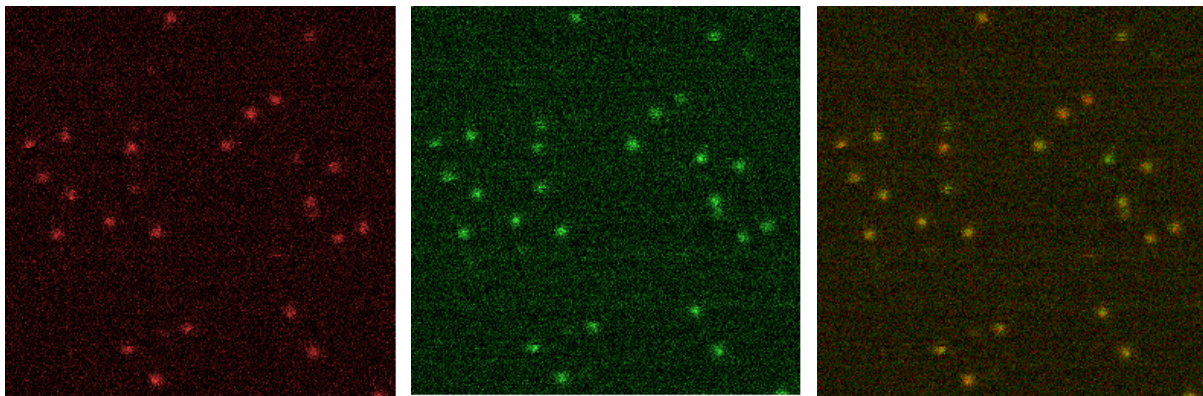
In Abb. 5.4 wird dies durch vier orange Doppelpfeile hervorgehoben. Sie symbolisieren den durchschnittlichen Wert des Phasenwinkels der Fluoreszenz (schwarze Kurve) sowie seine zeitliche Veränderung. Der Phasenwinkel gibt, unter der Prämisse des ausschließlichen Auftretens linear polarisierten Lichts, die Fluoreszenzpolarisationsrichtung als Raumwinkel zwischen den beiden orthogonalen Detektionsrichtungen am polarisierenden Strahlteilerwürfel an. Ein Phasenwinkel von 90° bzw. 0° entspricht demnach der ausschließlichen Fluoreszenzdetektion an einer Photodiode.

Innerhalb von 100 sec kam es im vorliegenden Beispiel zu drei Polarisationsprüngen und damit zur Einnahme vierer verschiedener Polarisationsrichtungen des linear polarisierten Emissionslichts.

Trimere

LHCII-Trimere der Mutante S3Ch unterschieden sich bei gleichem Immobilisations- und Meßprinzip deutlich im Polarisationsgrad ihrer Fluoreszenz von dem der Monomere. In konfokalen Fluoreszenzbildern einzelner Komplexe wurde in den meisten Fällen eine Überlagerung der Emission beider orthogonaler Polarisationsrichtungen detektiert (orangene Bildpunkte in Abb. 5.5, die durch eine Rot-Grün-Überlagerung entstanden sind).

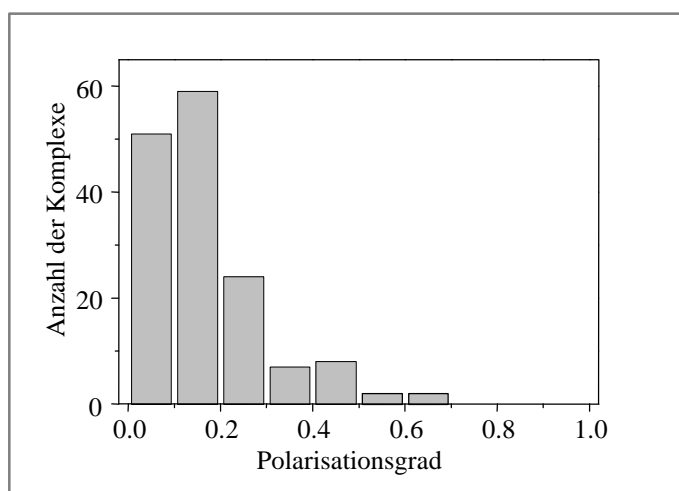
Abb. 5.5: Detektion der Emission zweier Polarisationsrichtungen von LHCII-Trimeren in HRP-beschichteten Flüssigkeitszellen



LHCII-Trimere der Mutanten S3Ch wurden auf HRP-beschichteten Deckgläsern nach Kapitel 3.4.2 immobilisiert. In einzelmolekularen Messungen wurden Momentaufnahmen der Fluoreszenz durchgeführt (vgl. Kapitel 3.5.1). Das linke und das mittlere Bild stellt die Chlorophyllfluoreszenz einzelner LHCII-Komplexe zweier orthogonaler Polarisationsrichtungen als rote und grüne Bildpunkte dar. Das rechte Bild ist eine Übereinanderlagerung der genannten Bilder. Erscheint hier ein Bildpunkt orange, weist dies auf eine gleichzeitige Fluoreszenzdetektion beider Polarisationsrichtungen hin.

Eine Auswertung von 153 Zeitspuren der Fluoreszenzanteile beider Polarisationsrichtungen (vgl. Kapitel 5.2.2, Anfangswert der Fluoreszenz in [„counts/sec“] zur Polarisationsberechnung verwendet) ergab einen durchschnittlichen Polarisationsgrad zwischen 0 und 0,2 (vgl. Abb. 5.6). Dies bedeutet, daß der Anteil beider Polarisationsrichtungen nahezu gleich groß war und damit die LHCII-Trimerfluoreszenz als eher depolarisiert angesehen werden kann.

Abb. 5.6: Polarisationsgrad der Fluoreszenz von LHCII-Trimeren



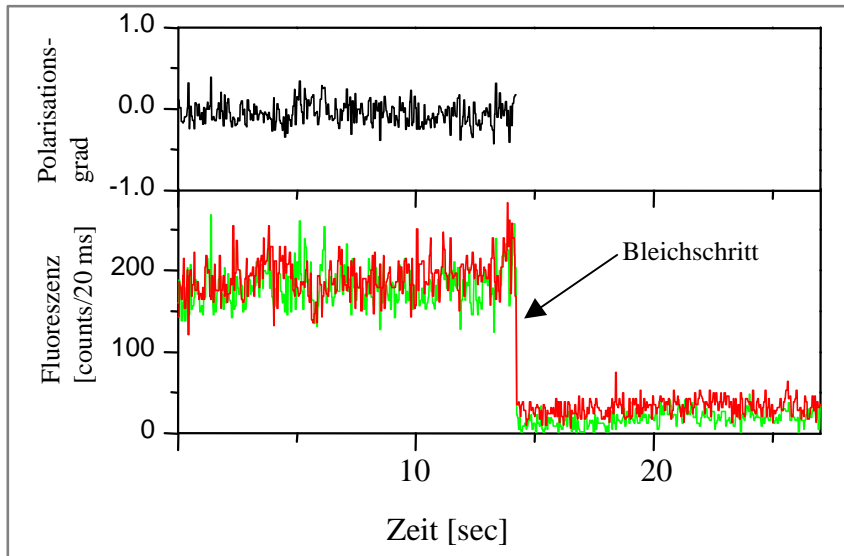
LHCII-Trimere der Mutante S3Ch wurden auf HRP-beschichteten Deckgläsern nach Kapitel 3.4.2 immobilisiert. Von 153 LHCII-Komplexen wurde in Zeitspuren (nach Kapitel 3.5.2) der Anteil zweier orthogonaler Polarisationsrichtungen der Chlorophyllfluoreszenz quantifiziert und daraus der Polarisationsgrad bestimmt.

Insgesamt wurde bei 72% aller vermessener Trimere eine Emission von unpolarisiertem Licht detektiert. Auch nativer LHCII zeigte, immobilisiert auf einer HRP-beschichteten Oberfläche, trotz Abwesenheit einer „His6-tag“-Sequenz eine weitgehendste Fluoreszenzdepolarisation.

5.2.2 Bleichverhalten der Chlorophylle im Monomer und Trimer

Das Fluoreszenzverhalten einzelner LHCII-Monomere und Trimere der Mutante S3Ch wurde auch durch Chlorophyllbleichexperimente näher charakterisiert. Dazu wurde die Variation der Fluoreszenzintensität einzelner LHCII-Komplexe über die Zeit (nach Kapitel 3.5.2) gemessen. Konnte in vorhergehenden Versuchen mit PVA-immobilisierten LHCII-Trimeren eine dreistufige Abnahme der Chlorophyllfluoreszenz gezeigt werden (vgl. Tietz *et al.*, 2001), wurde an HRP-immobilisierten Komplexen in Detergens in vielen Fällen eine Fluoreszenzlöschung in einem einzigen Schritt gemessen (vgl. Abb. 5.7). Auch native LHCII-Trimere (Präparation nach Krupa *et al.*, 1987) zeigten plötzlich ein einstufiges Bleichverhalten und dies unabhängig vom umgebenden Medium (Detergens oder PVA).

Abb. 5.7 Chlorophyllbleichen in LHCII-Trimeren in einem distinkten Schritt



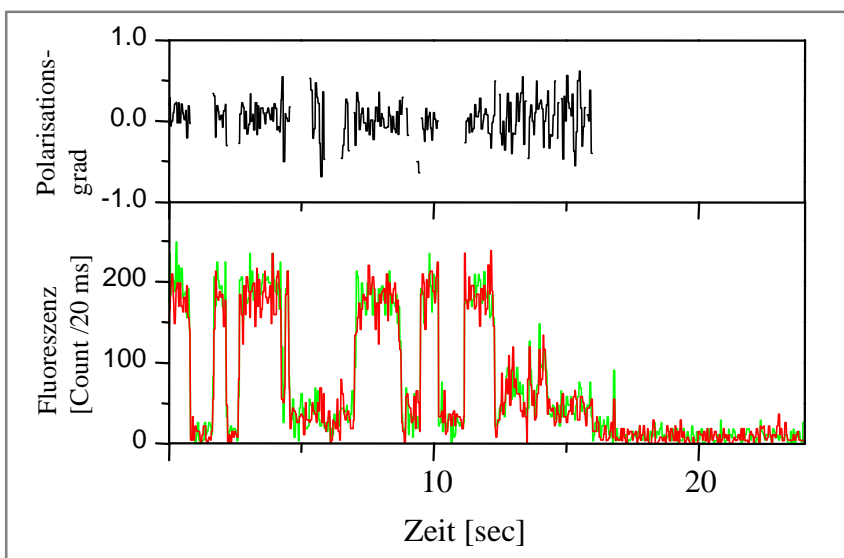
LHCII-Trimeren der Mutante S3Ch wurden nach Kapitel 3.4.2 auf HRP-beschichteten Deckgläsern immobilisiert. Dargestellt sind Zeitspuren (vgl. Kapitel 3.5.2) zweier orthogonaler Polarisationsrichtungen als grüne und rote Kurven. Aus den beiden Fluoreszenzintensitäten wurde der Polarisationsgrad (schwarze Kurve) berechnet (vgl. Kapitel 3.5.2, Formel hier jedoch vorzeichenbehaftet verwendet).

Das Bleichen der LHCII-Monomere erfolgte sowohl in den PVA-Messungen von Tietz *et al.* (2001) als auch in den Versuchen dieser Arbeit in Detergens in einem Schritt.

Einen bedeutenden Einfluß auf die Fluoreszenz hatte die Verwendung des Reduktionsmittels Na-Dithionit. Es eliminierte O_2 aus dem Meßsystem und konnte damit die Chlorophylle effektiv vor Photooxidation schützen. Ein Chlorophyllbleichen trat um Größenordnungen später auf.

Interessanter Weise stellte das Chlorophyllbleichen verhältnismäßig oft einen reversiblen Prozeß dar (vgl. Abb. 5.8). Nach einigen Sekunden der Abwesenheit einer Chlorophyllfluoreszenz konnte ein erneuter Emissionsanstieg in einem distinkten Schritt gemessen werden.

Abb. 5.8: Reversibles Bleichen der Chlorophylle in LHCII-Trimeren



LHCII-Trimeren wurden nach Kapitel 3.4.2 auf einem HRP-beschichteten Deckglas immobilisiert und fluorometrisch nach Kapitel 3.5.2 vermessen. Die rote und die grüne Kurve stellt die Fluoreszenzintensität zweier Polarisationsrichtungen dar, die schwarze Kurve den errechneten Polarisationsgrad (vgl. Kapitel 3.5.2, Formel hier jedoch vorzeichenbehaftet verwendet).

6. Technische Nutzbarkeit der Lichtsammel-effizienz von LHCII

Nach der gelungenen Erstellung eines biomimetischen Modells für ein pflanzliches Photosystem (Kapitel 4) sowie der genaueren Charakterisierung des LHCII-internen Energietransfers (Kapitel 5) sollten die erworbenen Kenntnisse zur technischen Nutzarmachung der effizienten Lichtsammlung des Komplexes angewendet werden. Angestrebt wurde, wie in Kapitel 1.4.2 erwähnt, die Verwendung der absorbierten Lichtenergie zur Stromgenerierung.

Erstes Ziel auf diesem Weg war die Immobilisation von LHCII auf dem Halbleiter TiO₂. Aus zahlreichen Veröffentlichungen (vgl. Kapitel 7.3.1) war bekannt, daß Interaktionen mit der Halbleiteroberfläche über ionische Wechselwirkungen stattfinden können. Daher wurde eine Konstruktion von LHCII-Mutanten mit einer Abfolge geladener AS in der Nähe des N-terminus angestrebt. Da die Angaben zum Ladungstyp des TiO₂ widersprüchlich waren, sollten zwei Mutanten, eine mit einer N-terminalen Häufung von negativen Ladungen (Mutante mit 6 Glutamaten = Glu6) und eine mit einer von positiven Ladungen (Mutante mit 6 Lysin = Lys6), hergestellt werden.

Neben der Konstruktion der richtigen LHCII-Mutante wurde auch die Wahl der passenden Detergenumgebung als kritisch für die Immobilisation auf dem Halbleiter angesehen. Bislang war noch kein Membranprotein auf diese Oberfläche aufgebracht worden.

6.1 Charakteristika der neuen Klone *Lys6* und *Glu6*

Die beiden Klone *Lys6* und *Glu6* wurden nach Kapitel 3.6 hergestellt und sollten nachfolgend zur Überexpression der entsprechenden Proteinmutanten genutzt werden. Bei *Lys6* konnte nach dem Standardansatz (Kapitel 3.7.1) die Bildung von „Inclusion bodies“ induziert werden. Bei *Glu6* traten dagegen einige Probleme auf. Eine Induktion der Proteinexpression durch IPTG konnte zwar durch eine Antikörperreaktion im Western Blot (vgl. Mick, 1999) nachgewiesen werden, doch war die Proteinmenge unzureichend, um weitergehende Versuche durchzuführen. Bakterienprotein und Lhcb-1 fanden sich nach der Inclusion body-Präparation zu gleichen Teilen im Proteinpellet wieder. Eine Steigerung der Überexpressionseffizienz konnte durch einen Wechsel des Nährmediums (NZCYM Broth EZMix™, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen statt LB-Medium nach Kapitel 3.7.1) nur in geringem Maße erreicht werden. Nachfolgend wurde daher ausschließlich mit dem Klon *Lys6* weiter gearbeitet.

Das *Lys6*-Protein zeigte eine gute Markierbarkeit der N-proximalen Cysteinbindestelle durch Maleimidfarbstoffe (in einem Laborpraktikum von S. Potthast, 2000 wurde eine ca. 80%ige Markierungsausbeute mit Tetramethylrhodaminmaleimid nachgewiesen) und konnte auch in Anwesenheit des Farbstoffs rekonstituiert werden.

LHCII dieses Klons wurde (nach Kapitel 3.2.3) über eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation von ungebundenem Chlorophyll und ungefalteten Protein gereinigt. Im Saccharosegradienten zeigte sich jedoch nach Zentrifugation neben der freien Pigment- und Monomerbande eine weitere, stärker sedimentierte pigmentierte Bande. In Messungen zum Fluoreszenzverhalten und des Circular Dichroismus konnten jedoch keinerlei Unterschiede zwischen dieser additiven Bande und den LHCII-Monomeren festgestellt werden. Erst ein schwach denaturierendes Gel (vgl. Wolf, 1998) offenbarte eine Verschiedenheit der Proben. So lief die stärker sedimentierte Bande im Gel langsamer als die LHCII-Monomere, zeigte also damit ein erhöhtes Molekulargewicht. Allerdings migrierte sie schneller als die als Referenz zugesetzten nativen LHCII-Trimere.

Eine ½ h Inkubation mit 5 mM DTT veränderte das Proteinlaufverhalten der fraglichen Bande im schwach denaturierenden Gel drastisch. Nun migrierten die Komplexe auf gleicher Höhe wie die Monomere. Offenbar waren zuvor LHCII-Dimere, verknüpft durch das N-proximale Cystein, aus dem Dichtegradienten eluiert worden. DTT reduzierte die Cystinbrücke zu zwei singulären Cysteinen und trennte damit die Dimere. Da im folgenden mit LHCII-Monomeren gearbeitet werden sollte, wurde weiteren Saccharose-Dichtegradienten das Reduktionsmittel TCEP zugegeben (Kapitel 3.2.3).

6.2 SDS-Abreicherung über eine HAP-Säule

Wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, fand in allen Versuchen die Rückfaltung des Lhcb-1 ausgehend vom denaturierten Protein in 2% SDS statt. Durch die Detergenswechselrekonstitution sowie die nachfolgende Aufreinigung der Komplexe im Saccharose-Dichtegradienten wurde der LHCII stark von SDS abgereichert. Eine vollständige Elimination des Detergens war jedoch nicht möglich.

Da alle Versuche zur Immobilisation von LHCII auf TiO₂ (vgl. Kapitel 6.3) eine möglichst vollständige Abtrennung des SDS von LHCII nahelegten, wurde eine Aufreinigung der Komplexe über eine HAP-Säule nach einem Rezept von Dong *et al.* (1997) angestrebt.

HAP ist ein kristallines Calciumphosphat der Struktur (Ca₅(PO₄)₃OH)₂, welches für die Aufreinigung vieler Proteine, Nucleinsäuren, Viren und anderer Makromoleküle verwendet wird (Information der Firma BioRad, München). Proteine immobilisieren auf HAP aufgrund zweier Interaktionsprinzipien, zum einen werden zwischen den Aminogruppen des Proteins und den Phosphatgruppen des HAP ionische Wechselwirkungen ausgebildet, zum anderen können Protein-Carboxygruppen von den Ca²⁺-Ionen komplexiert werden (Lottspeich und Zorbas, 1998). Je nach pI-Wert des aufzureinigenden Proteins ist daher die Elution von einer HAP-Matrix durch Zugabe von CaCl₂/MgCl₂ oder NaP möglich.

LHCII konnte in einem schwach molaren NaP-Puffer auf der Säule immobilisiert und mit einem hoch konzentrierten Puffer eluiert werden.

Die SDS-Abreicherung der LHCII-Komplexe fand auf der HAP-Säule statt, weil hier Proteine, nicht aber Detergentien, retardiert werden, wie Dong *et al.* (1997) zeigten. Die SDS-Abreicherung wurde von den Autoren als ein Detergenswechsel beschrieben. SDS kann nach ihrer Meinung über zwei Arten mit dem Protein interagieren. Zum einen werden Salzbrücken zwischen den Sulfatgruppen des SDS und den geladenen Aminosäuren des Proteins ausgebildet, zum anderen findet eine Interaktion der hydrophoben Proteindomänen mit der aliphatischen SDS-Kohlenstoffkette statt. Ein Waschen von HAP-immobilisiertem Protein mit einem niedrig molaren NaP-puffer und LM sollte beide Interaktionen inhibieren können. Das Phosphat sollte in Konkurrenz mit dem Sulfat des SDS treten, LM als ungeladenes Detergens den aliphatischen Teil des SDS verdrängen.

Die SDS-Abreicherung von LHCII erfolgte nach obigem Prinzip und soll in Anlehnung an Kapitel 3.8 hier nur kurz skizziert werden. Die LHCII-Komplexe wurden direkt aus der Rekonstitutionslösung auf die HAP-Säule aufgetragen und immobilisierten daran. Lhcb-1-gebundenes SDS wurde durch einen Puffer aus 0,1% LM und 100 mM NaP, pH 7,0 abgereichert und anschließend der Komplex von der HAP-Matrix durch Zugabe eines hochmolaren NaP-Puffers eluiert.

Die SDS-Abreicherung von LHCII der Mutante Lys6 über die HAP-Säule erfolgte mit deutlich höherer Ausbeute an eluierendem Protein im Vergleich zum Wildtypprotein D7f.3. Lys6 band aus der Rekonstitutionslösung heraus in deutlich größerem Maß an die Säulenmatrix,

was auf eine Interaktion des HAP mit den sechs positiven Ladungen der N-proximalen Lysin-domäne zurückgeführt wurde.

Die Elimination des SDS aus der LHCII-Lösung nach Beendigung der HAP-Chromatographie wurde durch zwei unabhängige Verfahren nachgewiesen.

- SDS-Nachweis in den Eluatfraktionen der HAP-Chromatographie mittels DC
- Charakterisierung des LHCII-Laufverhaltens im schwach denaturierenden Gel nach Suke-
nik *et al.* (1992) vor und nach SDS-Abreicherung

6.2.1 DC (nach Kapitel 3.9)

Auf eine DC-Platte wurden gleiche Mengen von LHCII einer Lys6-Rekonstitution vor und nach HAP-Säulenaufreinigung aufgetragen. Während in der Rekonstitutionslösung noch deutliche Mengen an SDS detektiert werden konnten, war in der HAP-Eluatfraktion kein Nachweis mehr möglich. Es wurden auf der gleichen DC auch Aliquots der Waschfraktionen zur SDS-Abreicherung chromatographiert. Hier konnten in den ersten 5 ml der Eluate abnehmende Mengen an SDS detektiert werden. Die letzten 4 ml der insgesamt 20 ml Eluatfraktionen waren dagegen offenbar SDS-frei (6. - 15. ml wurden nicht chromatographiert). Eine Dokumentation der SDS-Abreicherung war aufgrund des Nachweissystems nicht möglich (vgl. Kapitel 3.9).

6.2.2 Schwach denaturierendes Gel nach Sukenik *et al.* (1992)

Auf einem schwach denaturierenden Gel nach Sukenik *et al.* (1992) wurde zusätzlich die Abreicherung von an LHCII gebundenem SDS gezeigt.

E.van Hunnik postuliert für das obige Gelsystem eine Proteinaufspaltung aufgrund unterschiedlichen Molekulargewichts und unterschiedlicher Anzahl von Ladungen pro Protein (persönliche Mitteilung). Er verwendete das System zur Auftrennung von PSI, PSII und LHCII aus Chlorophyta-Thylakoiden in Form dreier distinkter Banden (van Hunnik *et al.*, 2001). Er zeigte, daß dieses Gelsystem so schonend war, daß auch die Thylakoid-gebundene Carboanhydrase während des Gellaufs ihre Aktivität behielt.

In Anlehnung an die Experimente E.van Hunniks wurde in den Versuchen dieser Arbeit für den rekonstituierten LHCII die Ausbildung einer singulären Pigment-Proteinbande im Gel erwartet. Es handelte sich schließlich bei der Probe um Proteine eines Bakterienklons mit identischer Aminosäuresequenz in jedem Molekül.

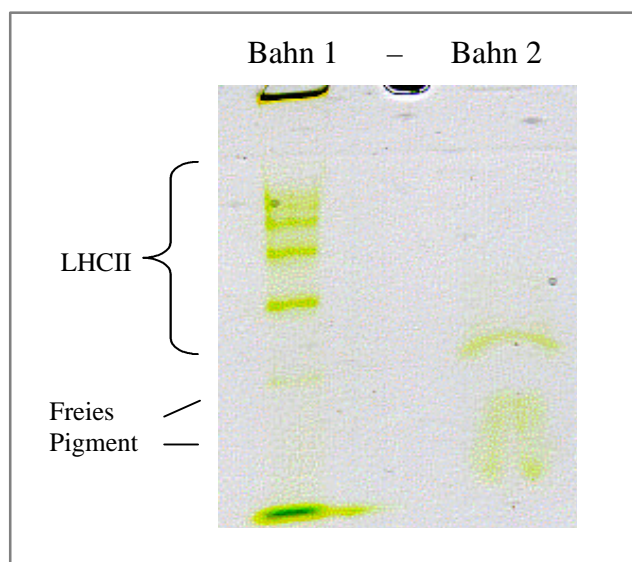
Statt dessen kam es zur Ausbildung von mindestens drei dickeren und mehreren dünnen Pigment/Protein-haltigen Banden (vgl. Abb. 6.1, Bahn 1). Eine Aufreinigung des Rekonstitutionsansatzes über die HAP-Säule änderte das Laufverhalten der Pigment-Protein-Komplex im Gel, jetzt wurde, wie zuvor erwartet, nur noch eine grüne Bande detektiert (Abb. 6.1, Bahn 2).

Da es in schwach denaturierenden LDS-Polyacrylamid-Gelen (vgl. Wolf, 1998) nie zu einer Auftrennung der LHCII-Komplexe in mehrere Banden gekommen war, was für eine Variation des Molekulargewichts in der Probe gesprochen hätte, wurde in diesem System die Anwesenheit unterschiedlicher Mengen SDS am Protein als Grund für das variable Laufverhalten schlußgefolgert.

Das in diesem Elektrophoresesystem eingesetzte DOC ist zwar selbst ein anionisches Detergens, interagierte aber im Versuch vermutlich nur sehr schwach mit dem LHCII und beein-

flußte daher wenig dessen Laufverhalten. SDS bindet dagegen im allgemeinen sehr fest an den Komplex und erhöhte im Rekonstitutionsansatz damit die Anzahl der negativen Ladungen pro Protein. Eine Proteinauftrennung aufgrund unterschiedlicher Polarität bei gleichem Molekulargewicht fand hier mit großer Wahrscheinlichkeit statt.

Abb. 6.1: schwach denaturierendes Gel nach Sukenik zum Nachweis der SDS-Abreicherung von LHCII in einer HAP-Säule



LHCII des Klons D7f.3 wurde über eine HAP-Säule von SDS befreit (vgl. Kapitel 3.8) und in einem schwach denaturierenden Gel nach Sukenik (vgl. Kapitel 3.1.4.1) aufgetrennt. Bahn 1 zeigt 2,5 µg einer LHCII-Rekonstitution vor HAP-Aufreinigung. Bahn 2 zeigt ein Aliquot der selben Probe nach HAP-Aufreinigung und NaP-Abreicherung durch Auskristallisieren bei 0°C.

Das Auftreten der einzelnen LHCII-Bande nach SDS-Abreicherung über die HAP-Säule (vgl. Abb. 6.1) sprach daher sehr für ein effizientes Entfernen des ionischen Detergens.

6.3 LHCII-Immobilisation auf TiO₂

Um sich dem Ziel einer photovoltaischen Zelle nach Grätzel mit LHCII als Lichtsammler und möglicherweise auch Sensitizer zu nähern (vgl. Kapitel 1.4.2), mußte der Komplex auf dem Halbleiter TiO₂ immobilisiert und über einen längeren Zeitraum stabilisiert werden.

J.Durrant des Imperial College, London arbeitet seit mehreren Jahren an der Immobilisation von Proteinen an der Halbleiteroberfläche, so daß zum Zeitpunkt dieser Versuche schon einige Erfahrungen bezüglich einer möglichen Bindung bestanden. Da J.Durrant jedoch nie mit Membranproteinen in Detergens gearbeitet hatte, mußte ein neues System etabliert werden. Hierfür wurden TiO₂-beschichtete Glasplatten von ihm zur Verfügung gestellt.

6.3.1 Bindung von LHCII-Cy5.5 an TiO₂

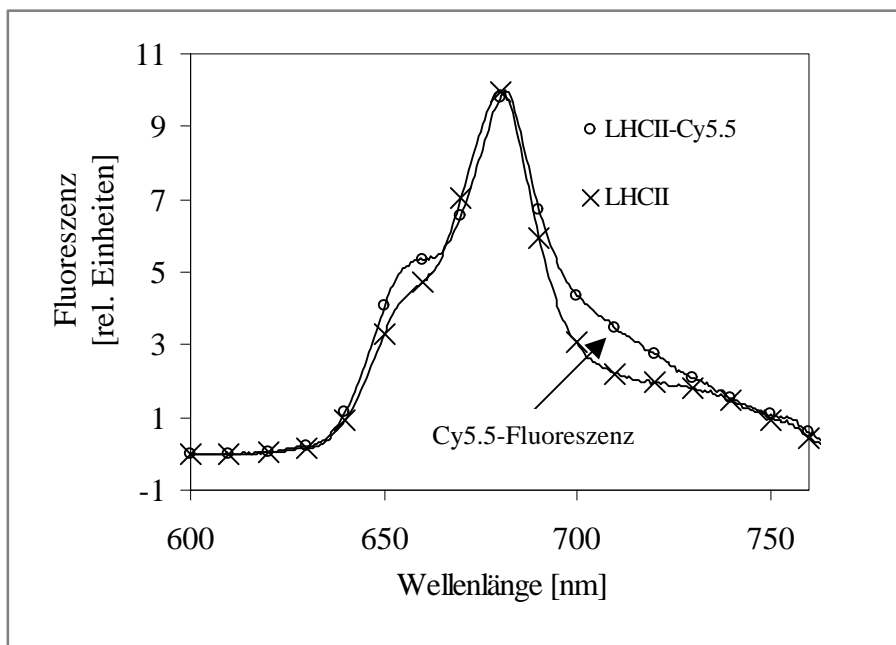
In einem ersten Schritt wurde überprüft, ob LHCII überhaupt an den Halbleiter binden kann, ohne auf die später geforderte Intaktheit der Komplexe zu achten. Da Chlorophylle in Deter-

gensumgebung spontan an die TiO_2 -Oberfläche binden, war die reine Pigmentdetektion auf dem Halbleiter kein Bindungskriterium.

Zur spezifischen Proteindetektion wurde das Lhcb-1 mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5.5 markiert. Um eine möglichst spezifische Cy5.5-Kopplung an Lhcb-1 zu erreichen, wurde der Farbstoff nach dem Rezept von Stöcklin (2000) umfunktionalisiert und anschließend mit der Mutante Lys6 (trägt ein singuläres Cystein im N-proximalen Bereich, vgl. Kapitel 3.6) zur Reaktion gebracht (Die Markierung von 100 μg Protein erfolgte abweichend vom Standardrezept bei pH 7,0 mit 100 nmol Farbstoff). Die Markierungsausbeute betrug ca. 50% des eingesetzten Proteins.

Freier Farbstoff wurde durch eine acetonische Fällung abgetrennt, das Protein anschließend rekonstituiert und über eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. LHCII-Komplexe mit und ohne Fluoreszenzfarbstoff wurden auf TiO_2 -Platten von J.Durrant inkubiert und anschließend von unspezifisch gekoppeltem LHCII gereinigt. Die fluorometrische Charakterisierung der Komplexe erfolgte mit der „Front face“-Technik.

Abb. 6.2: Emissionsspektrum von LHCII und LHCII-Cy, immobilisiert auf TiO_2



LHCII und LHCII-Cy5.5 der Mutante Lys6 wurden über einen Saccharose-Dichtegradienten aufgereinigt und anschließend photometrisch charakterisiert. Es wurden einmal 0,44 nmol LHCII in 400 μl Saccharose/LM/Tricine (nach Kapitel 3.2.3) und einmal 0,6 nmol LHCII-Cy5.5 in 500 μl Lösung gleicher Zusammensetzung auf eine TiO_2 -beschichtete Glasplatte von J.Durrant aufgetragen. Nach 24 h Inkubation auf Eis wurden die Platten für 30 min in einer Lösung aus 0,6 M Saccharose, 0,1% LM und 5 mM Tricine pH 7,8 auf Eis gelagert, um unspezifisch gebundenes Chlorophyll bzw. LHCII zu entfernen. Anschließend wurden die immobilisierten Komplexe mit der „Front face“-Technik charakterisiert. Dargestellt ist eine Chlb-Anregung bei 460 nm unter Verwendung der Standardmeßparameter (vgl. Kapitel 3.2.5). Die Spektren sind auf gleiche Maximalfluoreszenz normiert.

Nach Abb. 6.2 konnte bei selektiver Chlb-Anregung eine Fluoreszenz von Chlb, Chla und Cy5.5 gezeigt werden. Der Energietransfer von Chlb nach Chla konnte nicht gleichgesetzt werden mit einer Anwesenheit von LHCII-Komplexen. Kontrollversuche mit freiem Chlorophyll, immobilisiert auf TiO_2 in gleicher Detergensumgebung, zeigten eine vergleichbare Transfereffizienz. Der Energietransfer der Chlorophylle auf Cy5.5 bewies dagegen zumindest

die Anwesenheit des Lhcb-1. Interessanter Weise schien die Menge an gebundenem LHCII bzw. an immobilisierten Chlorophyllen bei Anwesenheit von Cy5.5 abzunehmen, trotz Einsatz einer größeren Proteinstoffmenge im LHCII-Cy5.5-Versuch war die Gesamtfluoreszenz herabgesetzt (nicht dargestellt).

Im nächsten Schritt mußte nun die Proteinbindung näher untersucht, die Effizienz der Bindung optimiert und die Intaktheit der LHCII-Komplexe nachgewiesen werden.

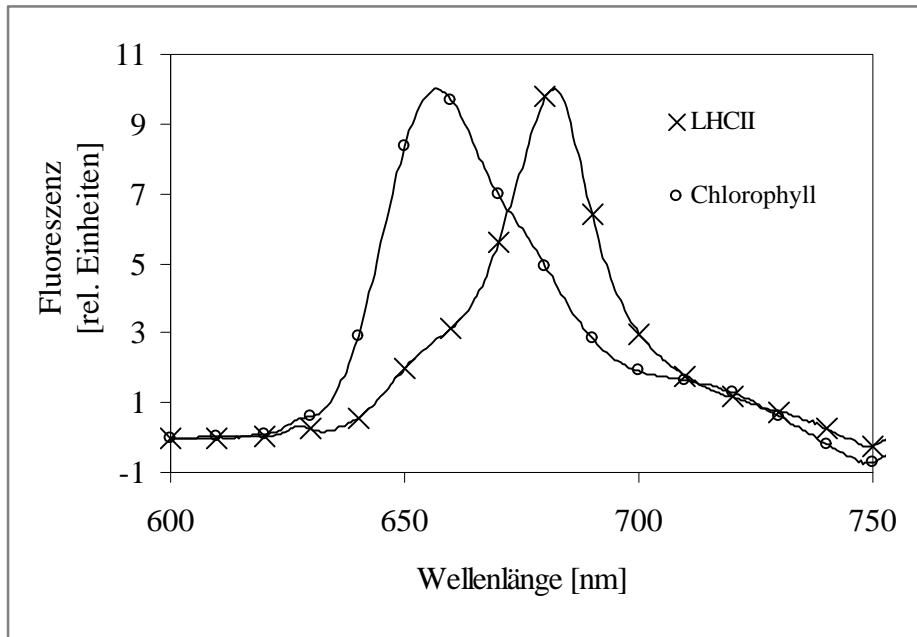
6.3.2 Bindung von LHCII an TiO₂ abhängig von der SDS-Konzentration im Medium

LHCII-Cy5.5 des obigen Versuchs (Kapitel 6.3.1), welches im Überstand verblieben war, wurde mit SDS auf eine Endkonzentration von 0,5% eingestellt und auf einer neuen TiO₂-Platte über Nacht inkubiert. Nach Entfernung des nicht gebundenen LHCII von der Oberfläche konnte in fluorometrischen Messungen nahezu keine Chlorophyll-Fluoreszenz detektiert werden. Es schien, als habe SDS die Proteinimmobilisation verhindert.

Im folgenden wurde die LHCII-Rekonstitutionslösung daher von SDS mittels einer HAP-Säule gereinigt (vgl. Kapitel 6.2). Nach Verlassen der HAP-Matrix und mehreren Entsalzungsschritten wurden die LHCII-Komplexe in einem Saccharose-Dichtegradienten von freiem Chlorophyll und ungefaltetem Protein gereinigt und anschließend auf TiO₂-Platten von J.Durrant sowie auf selbst hergestellten Platten (vgl. Kapitel 3.10 und 3.11) immobilisiert. Die Ergebnisse mit beiden Platten ähnelten sich sehr, so daß im folgenden nur auf die Versuche mit den selbst hergestellten näher eingegangen werden soll.

LHCII des Klons Lys6 wurde gemäß Kapitel 3.8 aufgereinigt und 2 Tage bei 0°C auf TiO₂ inkubiert. Nach 1½ h Lagerung der beschichteten Platte in Puffermedium fand eine fluorometrische Charakterisierung statt. Als Negativkontrolle wurde eine Probe freien Chlorophylls gleicher Konzentration und gleicher Aufbringungsmethode auf TiO₂ vermessen.

Abb. 6.3: Fluoreszenzemission von LHCII und freiem Chlorophyll, immobilisiert auf TiO₂ nach selektiver Anregung von Chlb



LHCII der Mutante Lys6 wurde nach Aufreinigung über eine HAP-Säule und nachfolgender Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation auf gleiche Absorption wie eine Probe freien Chlorophylls/Xanthophylls (Chla : Chlb = 1 : 1) eingestellt und 2 Tage bei 0°C auf TiO₂-beschichteten Glasplatten eigener Herstellung (Kapitel 3.10) immobilisiert. Eine LHCII-Stoffmenge von 0,15 nmol in 440 µl wurde dazu vorgelegt. Das Entfernen von ungekoppeltem LHCII bzw. Chlorophyll erfolgte in einer 1½ h Lagerung in 0,4 M Saccharose, 0,1% LM und 5 mM Tricine, pH 7,8. Der Energietransfer von Chlb nach Chla wurde im Fluorometer durch Anregung bei 460 nm gemessen. Dargestellt sind die auf maximale Chlorophyll-Fluoreszenz normierten Daten.

Wie aus Abb. 6.3 hervorgeht, konnte nur in den LHCII-Komplexen ein deutlicher Energietransfer von Chlb nach Chla detektiert werden. Das Emissionsspektrum des freien Chlorophylls unterschied sich deutlich von dem der LHCII-Probe. Die 1½ h Inkubation im Waschpuffer schien die unspezifischen Chla/Chlb-Interaktionen der freien Chlorophyllprobe deutlich reduziert zu haben. Die Anwesenheit intakter LHCII-Komplexe konnte im Umkehrschluß damit nachgewiesen werden. Der Energietransfer von Chlb nach Chla konnte nur auf diese Weise erklärt werden. In folgenden Experimenten wurde gezeigt, daß auch eine einstündige Inkubation in der Waschlösung zur Unterbindung unerwünschter Chlorophyllinteraktionen ausreichte.

6.3.3 Erste Quantifizierung einer Komplexbindung

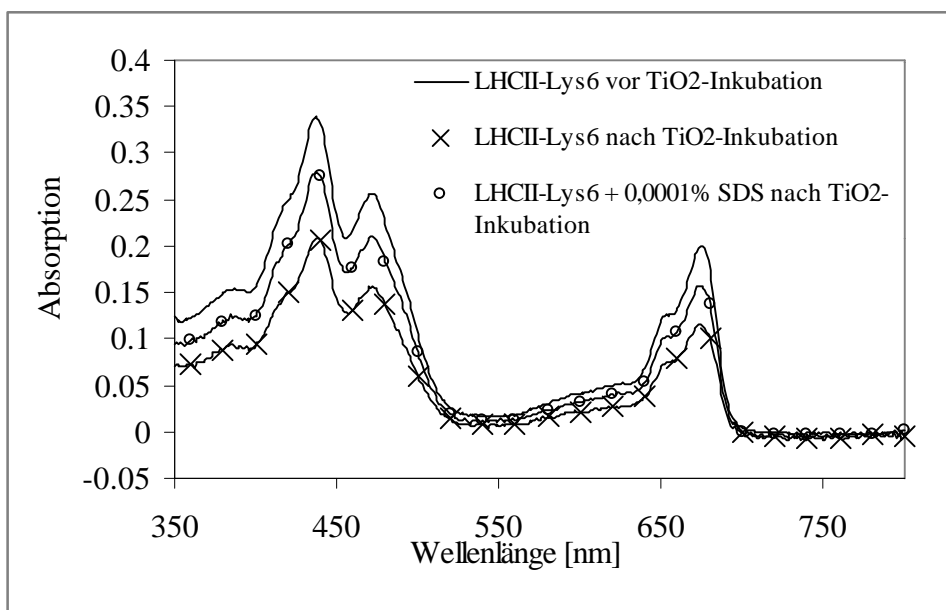
LHCII wurde vor und nach Inkubation auf TiO₂ photometrisch vermessen, um die Menge des an den Halbleiter gebundenen Proteins zu ermitteln. Der Fehler dieser Quantifizierung lag in der Nicht-Bestimmbarkeit des Anteils des LHCII, welcher nach Immobilisation auf TiO₂ im 1 - 2 h Waschschrift verloren ging. Eine direkte Quantifizierung des immobilisierten LHCII war aufgrund der fluorometrischen Charakterisierung mit Hilfe der „Front face“-Apparatur nicht möglich. Je nach Konzentration der Probe kam es hier zu unterschiedlichen Eindringtiefen des Excitationslicht in das Meßobjekt und damit zu unterschiedlich starker Anregung der Pigmente.

In zwei Versuchen wurde eine Quantifizierung durchgeführt.

- 500 µl einer 1,8 µM LHCII-Lösung wurde auf einem von J.Durrant zur Verfügung gestellten Halbleiter inkubiert. Die LHCII-Konzentration im Überstand war nach zweitägiger Inkubation nicht verringert.
- 440 µl einer 0,35 µM LHCII-Lösung wurde auf selbst hergestellten TiO₂-Platten zwei Tage inkubiert. Eine anschließende Absorptionsmessung des Überstandes zeigte eine Abnahme des LHCII-Gehaltes um 40%. Die gleiche Probe, welche vor TiO₂-Inkubation mit 0,001% SDS (dies entspricht 100 SDS-Molekülen pro LHCII) versetzt wurde, zeigte nur eine 20%ige Abnahme der Chlorophyllabsorption.

Eine Anreicherung der LHCII-Komplexe mit SDS beeinträchtigte damit signifikant die Proteinbindung an den Halbleiter.

Abb. 6.4: Absorption von LHCII vor und nach zweitägiger Inkubation auf TiO₂



LHCII-Lys6 wurde auf TiO₂ immobilisiert (nach Kapitel 3.11). Vor und nach Inkubation auf dem Halbleiter wurde die Absorption des LHCII-Überstandes gemessen.

Eine genaue Quantifizierung dieses Versuchs ergab eine Bindung von 0,03 nmol LHCII auf einer TiO₂-Fläche von 1 cm², dies entspricht einer Proteinmenge von 0,77 µg/cm².

6.3.4 Spezifität der Proteinbindung

Zur LHCII-Abreicherung von SDS war die Verwendung des Klons Lys6 in idealer Weise geeignet, da er deutlich besser als D7f.3 an die HAP-Säule band (vgl. Kapitel 6.2). Zu untersuchen blieb jedoch, ob der N-terminale Proteinbereich, bestehend aus 6 Lysinen auch einen Einfluß auf die TiO₂-Bindung hatte. Ursprünglich war dieser Klon hergestellt worden, um eine möglichst hohe Bindungseffizienz am Halbleiter zu erreichen, da nach Ansicht von J.Durrant positive Aminogruppen die Bindung induzieren.

In direkten Vergleichsmessungen konnte jedoch keine größere Komplexbindung des Klons Lys6 gegenüber dem Wildtypprotein (D7f.3) nachgewiesen werden. Ein Versuch mit der Glu6-Mutante (Lhcb-1 mit einer N-proximalen Abfolge von 6 Glutamaten) konnte nicht

durchgeführt werden, da die Proteinmutante nicht im ausreichenden Maß Inclusion bodies produzierte (vgl. Kapitel 6.1).

6.3.5 Versuche zur Immobilisierung von LHCII an TiO₂-beschichtetes ITO-Glas

Um festzustellen, ob LHCII selbst als Sensitizer agieren kann und nach Lichtanregung Elektronen in das Leitungsband des TiO₂ injiziert, wurde eine LHCII-Immobilisation an das auf ITO-Glas aufgebrachte Halbleitermaterial nach Kapitel 3.10 und 3.11 durchgeführt.

Das Bindungsergebnis war erstaunlich, nach 48 stündiger Inkubation von LHCII einer ungefähren Stoffmenge von 0,5 - 1 nmol (keine photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt) auf TiO₂ war der Überstand völlig entfärbt. LHCII hatte nahezu vollständig an die ca. 4 cm² große Halbleiterfläche gebunden (dies entspricht ~3 - 6 µg Lhcb-1/cm²). Wie nachfolgend in fluorometrischen Messungen zum komplexinternen Energietransfer gezeigt wurde, handelte es sich dabei auch um intakte LHCII-Komplexe. Eine Probe mit freiem Chlorophyll, immobilisiert an TiO₂, zeigte keinen energetischen Übergang von Chlb nach Chla (Ergebnisse von Lion, 2001).

Eine Elektronentransferfähigkeit des LHCII konnte dagegen nicht gezeigt werden. Zum Nachweis des Elektronentransfers wurde der von Rupprecht (1998) entwickelte Meßaufbau verwandt (die Messung fand davon abweichend im Fluoromax-2 statt, als Elektrolyt wurde eine wäßrige Lösung aus 0,05 M KJ, 0,004 M Jod und 50% Glycerin verwendet). Ein Stromfluß konnte nur bei Direktanregung des TiO₂ im UV-Bereich gemessen werden. Eine Anregung von LHCII in die Q_x- oder Q_y-Bande führten zu keiner Elektroneninjektion ins Leitungsband des Halbleiters.

7. Diskussion

7.1 Biomimetisches Modell aus LHCII und angekoppeltem Energieakzeptor

7.1.1 Maleimido-BTI erfüllt alle chemischen und spektroskopischen Eigenschaften eines Energieakzeptors für ein biomimetisches Modell

Cy5.5, NIR-Cy, IRD38 und Maleimido-BTI entsprechen den in Kapitel 1.3 geforderten Kriterien einer Lichtabsorption im NIR-Bereich sowie einer Fluoreszenzemission >690 nm und kamen daher in den Versuchen dieser Arbeit als potentielle Energieakzeptoren in Frage.

In den Experimenten zur Farbstoffmarkierung des Lhcb-1 sowie in den darauffolgenden Energietransfermessungen mit den LHCII-Farbstoff-Konstrukten traten die Vor- und Nachteile der einzelnen Fluorophore zu Tage. Als aussichtsreichster Kandidat für einen effizienten Energietransfer von Chla auf den Energieakzeptor stellte sich Maleimido-BTI heraus.

Maleimido-BTI gehört zur Gruppe der Rylene, welche besonders für ihre chemische, thermische und photochemische Stabilität bekannt sind (vgl. Kapitel 1.3, sowie pers. Mitteilung von C.Kohl). Nach Kopplung an das Lhcb-1 konnte der Farbstoff in jede beliebige Detergensumgebung gebracht werden, sogar eine Proteindenaturierung durch mehrminütiges Kochen veränderte nicht die Fluorophoreigenschaften.

Die Cyanine waren diesbezüglich deutlich weniger stabil. So führte ein Kochen von Lhcb-1-NIR-Cy zur partiellen Degradation des Farbstoffs (sichtbar im analytischen Gel), eine Inkubation von IRD38 in Gegenwart eines hohen pH-Werts oder primärer Aminogruppen führte zu dessen Zerstörung (vgl. Kapitel 4.1.2).

Für zukünftige einzelmolekulare Untersuchungen spielt auch die photochemische Stabilität der Fluorophore eine bedeutende Rolle. Erste Versuche mit IRD38 zeigten bei einer Direktanregung mit dem Farbstofflaser (Kapitel 4.2.3) auch nach Zugabe des Reduktionsmittels N-Dithionit ein Ausbleichen im Bereich einiger Sekunden. Er könnte deshalb vermutlich nur eingeschränkt verwendet werden. Von Maleimido-BTI wird hier eine deutlich höhere Stabilität erwartet.

Darüber hinaus zeigte Maleimido-BTI bei 297K und 77K ein äquivalentes Fluoreszenzverhalten. Anders als Cy5.5, welches bei 77K hypsochrom verschoben fluoreszierte und damit in der Emission kaum mehr von komplexgebundenem Chla unterscheidbar war, lag bei Maleimido-BTI in jedem Fall das Emissionsmaximum bei 735 nm (Kapitel 4.1.1).

Daneben traten bei Maleimido-BTI in 77K-Messungen keine Fluoreszenzinhomogenitäten zu Tage. NIR-Cy und Cy5.5 zeigten hier eine Mehrgipfligkeit des Emissionsspektrums, was auf das Auftreten verschiedener Molekülspezies in der Farbstoffprobe zurückgeführt wurde. Je nach Excitationsmaximum wurden variierende Emissionsmaxima bei 77K gemessen (vgl. Stöcklin, 2000). Eine Erklärung dieses Phänomens über das Auftreten verschiedener Isomere des Cyaninfarbstoffs wurde zumindest für Cy5.5 ausgeschlossen. Widengren und Schwille (2000) konnten an Cy5 zwar eine photoinduzierte Isomierierung nachweisen, zeigten jedoch gleichzeitig einen nahezu vollständigen Verlust der Fluoreszenzemission in der cis-Form. Da in der Arbeit hierfür keine Hinweise gefunden wurden (beim Energietransfer auf das cis-Isomer hätte eine Energietransferberechnung über die Abnahme der Donorfluoreszenz höhere

Werte liefern müssen als durch eine Quantifikation über die stimulierte Akzeptorfluoreszenz (vgl. Kapitel 4.2.1.2), kamen für die Farbstoffinhomogenitäten nur Farbstoffabbauprodukte oder Vorstufen in Frage. Diese müssen jedoch eine intakte funktionelle Gruppe getragen haben, da alle Effekte an Lhcb-1-gebundenem Cyaninfarbstoff nachweisbar waren.

Auch die funktionelle Gruppe des Maleimido-BTI war vorteilhaft gegenüber den reaktiven Gruppen der Cyanine (NHS-Ester und NCS-Gruppe). Da Lhcb-1 nur ein Cystein besitzt (79. AS), konnte nach Mutation dieser AS gegen Serin ein singuläres Cystein an jeder beliebigen Stelle des Proteins platziert werden. In der Arbeitsgruppe lagen Punktmutanten mit einem N-proximalen Cystein vor, so daß eine ortsspezifische Markierung des N-terminus mit Maleimido-BTI erfolgen konnte.

Die Cyanine besaßen dagegen aminoreaktive Gruppen, die durch die Wahl des optimalen pH-Werts zu einer selektiven N-terminalen Markierung nutzbar werden sollten (vgl. Kapitel 1.3). Für Cy5.5 wurde dies erreicht, neben einigem mehrfach markierten Protein konnte nach einer Proteinaufreinigung mittels präparativer Gelelektrophorese Lhcb-1-Cy5.5 in reiner Form isoliert werden. Für NIR-Cy und IRD38 gelang eine solche ortsspezifische Markierung nicht, die NCS-Gruppe erlaubte in beiden Fällen keine selektive Markierung der N-terminalen AS. Eine Umfunktionalisierung der reaktiven Gruppe in eine Maleimido-Gruppe wurde daher durchgeführt. Die Umfunktionalisierungsreaktion verlief mit einer geringen Ausbeute an SH-reaktivem Farbstoff, nachfolgend konnte nur 5 - 10% des eingesetzten Lhcb-1 markiert werden.

Neben der eigentlichen ortsspezifischen Markierung, die mit der größten Ausbeute (50% des eingesetzten Proteins) durch Maleimido-BTI erfolgte, hatte die reaktive Gruppe des Rylens einen weiteren großen Vorteil gegenüber den NCS- und NHS-Funktionen. So zeigten letztere eine schlechte Lagerbarkeit. Cy5.5 konnte trotz wasserfreier Aufbewahrung auf Silikat bei -20 °C nur über einen Zeitraum von 6 Monaten genutzt werden, dann war die reaktive Gruppe offensichtlich zerstört. Eine Markierung von Lhcb-1 erfolgte nur noch mit sehr geringer Ausbeute. Generell sind Maleimido- NHS- und NCS-Gruppen feuchtigkeitssensitiv (vgl. Mujumdar, 1993), die Maleimidgruppe zeigte jedoch in diesen Versuchen die beste Stabilität.

Einen bedeutenden Nachteil hatte jedoch die Verwendung von Maleimido-BTI. Der Farbstoff zeigte in Detergenumgebung nur eine geringe Fluoreszenzquantenausbeute. Diese ließ sich durch Variation der Detergenumgebung zwar für Lhcb-1-BTI deutlich steigern (Kapitel 4.1.2), in LHCII-BTI-Messungen war die Variation der Farbstoffumgebung jedoch nicht erfolgreich (Kapitel 4.2.4). Die Fluoreszenzen der Cyaninfarbstoffe lagen hier deutlich höher, was auf ihre besserer Wasserlöslichkeit zurückgeführt wurde. In organischem Lösungsmittel zeigte auch das stark hydrophobe Maleimido-BTI eine deutlich sichtbare Fluoreszenz ($f_{\text{Maleimido-BTI}} = 0,1$).

Trotzdem überwogen die angesprochenen Vorteile des Maleimido-BTI, so daß von ihm am ehesten die Generierung eines biomimetischen Modells für ein Photosystem erwartet wurde.

7.1.2 Biomimetisches Modell aus LHCII und einem Energieakzeptor durch LHCII-BTI-Konstrukt realisiert

Das LHCII-BTI-Konstrukt wurde spektroskopisch untersucht und über die Abnahme der Chla-Fluoreszenzquantenausbeute in Anwesenheit von Maleimido-BTI ein Energietransfer von Chla auf den Farbstoff von ~70% bei 297K und mindestens ~76% bei 77K errechnet (vgl. Kapitel 4.2.4.3). Es handelte sich hierbei höchstwahrscheinlich um einen Resonanztransfer der Energie, wie Kapitel 7.1.4 darlegt. Damit wurde ein erstes Modell eines pflanzlichen Photosystems aus LHCII und Energieakzeptor realisiert.

Nachfolgend soll beleuchtet werden, ob die Energietransfereffizienz (ET) damit möglicherweise noch unterschätzt wurde. Entsprach der Wert von 70% dem kompletten gerichteten Übergang, konnte also 30% der Anregungsenergie nicht übertragen werden? Oder lag die ET in der Nähe von 100% und wurde durch andere Phänomene maskiert?

Um dies zu beurteilen, werden an dieser Stelle mögliche Szenarien zur Maskierung eines nahezu vollständigen Energietransfers beleuchtet.

Szenario a

Der Energietransfer von Chla auf Maleimido-BTI betrug 100% und erschien in den Fluoreszenzmessungen vermindert durch einen Energierücktransfer vom Farbstoff zum Chlorophyll von 30%.

Ein Energierücktransfer vom Farbstoff auf das Chlorophyll konnte nicht ausgeschlossen werden. Da jedoch auch keine Hinweise für eine ET einer Größenordnung von 30% gefunden wurden, sollen an dieser Stelle mögliche Limitationen für einen solchen Übergang dargelegt werden.

Es wurde von einem energetischen Übergang zwischen Chla und Farbstoff nach dem Förstermechanismus ausgegangen (vgl. Kapitel 7.1.4). D.h. die Effizienz des Energietransfers hing neben der spektralen Überlappung von Donoremission und Akzeptorabsorption im wesentlichen vom Abstand R zwischen Donor und Akzeptor und der Dipol-Dipol-Orientierung der am Energietransfer beteiligten Chromophore (κ^2) ab. Da sich weder R noch κ^2 für einen potentiellen Energierücktransfer vom Akzeptor zum Donor änderten, spielte hier nur die modifizierte spektrale Überlappung der Chromophore eine Rolle (nun war die Überlappung der Akzeptorfluoreszenz mit der Donorabsorption wichtig). Unter Vorgabe eines festen κ^2 (s.u.) wurde daher R_0 , also der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, bei dem 50% der Anregungsenergie übertragen werden kann, für beide Energietransferrichtungen bestimmt.

R_0 lag für den Übergang von Chla auf den Maleimido-BTI (vgl. Kapitel 4.1.3) bei 297K 1,7 mal höher als das R_0 für den Energierücktransfer. D.h., Chla und Maleimido-BTI hätten für einen Energietransfer in Richtung des Farbstoffs 1,7 mal weiter entfernt sein können als für einen Übergang in die entgegengesetzte Richtung bei gleicher ET. Die Ursache dafür lag in dem großen Stokes-Shift (über 30 nm) und der geringen Fluoreszenzquantenausbeute des Farbstoffs begründet.

Vermutlich wurde das R_0 für den Energierücktransfer (Maleimido-BTI \rightarrow Chla) in dieser Überlegung noch deutlich überschätzt. Als Extinktionskoeffizient des Akzeptors wurde der des gesamten LHCII verwendet. Damit wurde angenommen, daß alle Chlorophylle eines Komplexes untereinander so stark gekoppelt sind, daß man von einem einzigen Akzeptor mit dem entsprechend hohen Extinktionskoeffizienten ausgehen kann. D.h. alle Chlorophylle müßten ein Chromophorensystem bilden, auf das der Farbstoff seine Energie überträgt.

Nun liegt zwar im LHCII eine Kopplung zwischen den Chlorophyllen vor, doch besteht diese Kopplung aufgrund der variierenden spektroskopischen Eigenschaften der Pigmente im wesentlichen in eine Richtung, vom kurzwelligst absorbierenden Chlorophyll zum langwelligst absorbierenden Chlorophyll. Eine Division der Extinktionskoeffizientenkurve von LHCII durch 8 zur Bestimmung des kleinst möglichen Überlappungsintegrals zwischen Farbstofffluoreszenz und Chla-Absorption (vgl. Kapitel 4.1.3) erbrachte daher ein um maximal 28% vermindertes R_0 für den Rücktransfer (Die Division erfolgte durch die Zahl 8, da 8 Chla pro LHCII bestimmt wurden und Chla am wesentlichsten in den potentiellen Energietransfer involviert sein würde). Damit lag das R_0 für den Hintransfer von Chla auf den Farbstoff nicht nur 1,7 mal höher, sondern möglicherweise (je nach Anzahl der Chla, die bei einem potentiellen Energierücktransfer involviert wären) bis zu 2,3 mal höher.

Nicht beachtet werden konnte bei diesen Überlegungen, daß zudem die Chlorophylle in unterschiedlichem Abstand zum Farbstoff vorlagen, d.h. R_1 - R_8 der 8 Chla hätten berücksichtigt werden müssen (vgl. hierfür die relevanten Formeln in Kapitel 9.3). Aufgrund der Unkenntnis der relativen Lage des Farbstoffs am kristallographisch nicht aufgelösten N-terminus (vgl. Kapitel 7.1.3) blieben die Abstände der Komplexpigmente zum Farbstoff unbekannt. Es mußte die Vereinfachung $R_1 = R_2 \dots = R_8$ gemacht werden.

Anders verhielt es sich beim Energiehintransfer (Chla \rightarrow Maleimido-BTI). Hier führte die Anwesenheit mehrerer Donoren nicht zu Fehleinschätzungen von R_0 . Während in seine Berechnung (vgl. Kapitel 4.1.3) die Konzentration des Akzeptors über den Extinktionskoeffizienten eingeht, bleibt die Konzentration des Donors unberücksichtigt (die Fluoreszenzquantenausbeute ist hier der einzige donorbezogene Wert für die R_0 -Berechnung). Veranschaulicht wird diese Phänomen auch durch die Formeln in Kapitel 9.3 (bei gleichem Abstand aller Donoren zum Akzeptor nivelliert sich Formel 2 zu der für die Berechnung des R_0 im 1 Donor- und 1 Akzeptor-System (Formel 1), sonst entspricht R_0 dem Mittelwert aller möglichen Donor/Akzeptor-Übergänge).

Nun konnte auch bei einem bis zum Faktor 2,3 differierenden R_0 für den Hin- und Rücktransfer ein Energierücktransfer von 30% aufgetreten sein, vorausgesetzt das R_0 für den Übergang vom Farbstoff auf Chla hätte im Bereich des molekularen Abstands R zwischen Donor und Akzeptor gelegen. Das deutlich größere R_0 für den Energiehintransfer hätte dann keine entscheidende Rolle gespielt. Da R nicht bekannt war, kann hier nur die Wahrscheinlichkeit eines solchen Szenarios eingegrenzt werden.

In Kapitel 4.1.3 wurde R_0 für zwei verschiedene κ^2 berechnet. κ^2 gibt Auskunft über die Orientierung der Dipole der am energetischen Übergang beteiligten Chromophore. Ein $\kappa^2 = 4$ entspricht einer parallelen Anordnung der Dipolmomente und damit einer Maximierung des potentiellen R_0 . Ein $\kappa^2 = 0$ dagegen entspricht einer senkrechten Orientierung der Dipolmomente zueinander, R_0 wird null, ein Energietransfer findet nicht statt.

Aufgrund der Unkenntnis der Dipolmomente von Chla und Farbstoff im LHCII-Farbstoff-Konstrukt wurde nur $\kappa^2 = 0$ ausgeschlossen. Sonst konnte κ^2 prinzipiell jeden beliebigen Wert annehmen. Daher wurde zunächst einmal mit $\kappa^2 = 4$ gerechnet, um das maximal mögliche R_0 für den Übergang zwischen Chla und Maleimido-BTI in beiden Richtungen zu quantifizieren. R_0 lag dann für den Übergang von Chla auf den Farbstoff bei 78 Å, für den Rücktransfer dagegen bei maximal 46 Å (bei Bestimmung des Überlappungsintegrals mit dem Extinktionskoeffizienten von $546.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), konnte aber bis zu 33 Å reduziert sein unter Annahme eines verringerten Überlappungsintegrals durch einen kleineren Extinktionskoeffizienten von Chla (s.o.).

Weitere Überlegungen zum κ^2 zeigen jedoch, daß ein Wert von 4 als unwahrscheinlichstes Szenario gewählt wurde. Ist im Meßsystem einer der beiden Reaktionspartner in seinem Di-

polmoment fix, kann $\kappa^2 = 4$ nur bei einer einzigen Dipolorientierung des nicht fixierten Reaktionspartners (parallele Orientierung der Dipolmomente) erreicht werden. Für ein κ^2 nahe Null gibt es dagegen unendlich viele Möglichkeiten (Van der Meer *et al.*, 1994).

Im vorliegenden LHCII-Farbstoff-Konstrukt mußte für Chla eine Fixierung des Dipolmoments aufgrund des umgebenden Proteingerüsts gefordert werden. Nur für Maleimido-BTI bestand eine potentielle Möglichkeit zur Variation der Dipolorientierung. Im System galt daher die Einschränkung $0 < \kappa^2 \ll 4$.

In Kapitel 4.1.3 wurde aus diesem Grund R_0 ebenfalls für $\kappa^2 = 2/3$ berechnet. Die Annahme von $\kappa^2 = 2/3$ war hier willkürlich, da dieser Wert normalerweise nur verwendet wird, wenn Donor und Akzeptor in einem System völlig frei beweglich sind und damit die Dipol-Dipol-Orientierungen zufällig. Ein κ^2 dieser Größenordnung war aus obigen Gründen jedoch deutlich wahrscheinlicher als $\kappa^2 = 4$ und wurde genutzt, um die wahrscheinlichste Größenordnung von R_0 zu bestimmen. So lag R_0 dann für den Hintransfer bei $\sim 58 \text{ \AA}$ und für den Rücktransfer bei $\sim 34 \text{ \AA}$ (bzw. 24 \AA unter Verwendung des geringeren Überlappungsintegrals).

Mit den hier gemachten Einschränkungen zur Höhe des R_0 -Werts verringert sich die Höhe des möglichen Energierücktransfers vom Maleimido-BTI zum Chla. Ob dabei eine ET von 30% ausgeschlossen werden kann, ergeben die vorliegenden Daten nicht. Bei Annahme der obigen R_0 -Werte könnte ein Energierücktransfer dann vernachlässigt werden, wenn man zur Berechnung des försterkritischen Abstands das geringst mögliche Überlappungsintegral verwendet (bei einem R_0 von 24 \AA wäre $ET_{\text{Maleimido-BTI Chla}} = 1\%$, bei einem R_0 von 34 \AA dagegen schon $ET = 9\%$, diese Berechnung ergibt sich aus der Bestimmung von $R = 50 \text{ \AA}$ aus $R_0 = 58 \text{ \AA}$ für den Energiehintransfer und der gemessenen ET von 70%). Zur genaueren Determinierung eines potentiellen Energierücktransfers wäre eine weitere Einschränkung von κ^2 notwendig, wie sie möglicherweise in Polarisationsmessungen erfolgen könnte (vgl. Van der Meer *et al.*, 1994), oder aber eine erste Abschätzung des R zwischen Donor und Akzeptor.

Nicht berücksichtigt wurde bei diesen Überlegungen bislang der Einfluß der Fluoreszenzlebensdauern (τ) beider beteiligter Chromophore. Solange beide τ deutlich größer sind als die Geschwindigkeit des Energietransfers, gelten alle obigen Annahmen für einen Energiehin- und -rücktransfer nach Förster. Sollten aber die beiden τ deutlich von einander variieren und ein τ darüber hinaus in das Zeitfenster des energetischen Übergangs fallen, käme es zu einem Energietransfer ausschließlich in Richtung des Chromophors mit dem kleineren τ . Auch sehr große R_0 -Werte für den Übergang in entgegengesetzter Richtung wären dann bedeutungslos. Da τ für Maleimido-BTI völlig unbekannt ist und auch die Geschwindigkeit des Energietransfers nicht bestimmt wurde, können an dieser Stelle nur theoretische Überlegungen angestellt werden.

So beträgt τ von LHCII $4,3 \text{ ns}$ (Schödel *et al.*, 1998). Bei Annahme eines Energietransfers im Picosekundenbereich müßte τ von Maleimido-BTI nur ebenfalls im Nanosekundenbereich liegen, um auf die Energietransferprozesse im biomimetischen Modell keinen Einfluß zu haben. τ von Fluoreszenzfarbstoffen liegen meistens im Nanosekundenbereich, weshalb diese Überlegung durchaus realistisch sein könnte. Die Geschwindigkeit des Energietransfers dagegen ist reine Spekulation und müßte in zeitaufgelösten Messungen bestimmt werden. Grundlage für die Annahme einer Größenordnung von Picosekunden bilden die komplexinternen Energietransferprozesse des LHCII, die den ps-Bereich nicht übersteigen (vgl. Kapitel 1.2). Aber möglicherweise kann der Energietransfer von komplexgebundenem Chla auf eine synthetische Energiefalle auch langsamer erfolgen.

Szenario b

Der Energietransfer von Chla auf Maleimido-BTI betrug 100% und erschien in den Fluoreszenzmessungen vermindert durch eine partielle Unstrukturiertheit im LHCII. 30% des Chla war nicht gekoppelt und trug daher nicht zum Energietransfer auf den Farbstoff bei.

Diese Hypothese konnte zumindest teilweise widerlegt werden. So konnte zwar in LHCII-Farbstoff-Konstrukten eine partielle Unstrukturiertheit detektiert werden (vgl. auch Kapitel 7.1.3), doch war es unwahrscheinlich, daß 30% des Chla nicht zum Energietransfer auf Maleimido-BTI beitrug. Dies zeigten Energietransfermessungen am LHCII-BTI bei 77K. Hier wurde eine Veränderung des Chla-Emissionsspektrums bei Energietransfer auf Maleimido-BTI detektiert. So war der Anteil kurzwelliger Fluoreszenz (< 680 nm) erhöht im Vergleich zum Emissionsmaximum bei 680 nm (vgl. Kapitel 4.2.4.3). Die Fluoreszenzhalbwidthbreite war größer als die des Chla in LHCII.

Möglicherweise wurde diese Verbreiterung durch Chla ausgelöst, welches nur schwach mit den besonders langwellig emittierenden Chla gekoppelt war und daher seine Anregungsenergie nicht auf Maleimido-BTI übertragen konnte. Zurückzuführen wäre dies auf eine Störung des komplexinternen Energietransfers durch den Farbstoff (mögliche Einflußnahmen von Maleimido-BTI auf die Komplexstruktur vgl. Kapitel 7.1.3).

Es ist daher nicht unwahrscheinlich, daß der Energietransfer von Chla auf den Farbstoff bei einer Chlorophyllkopplung, wie sie im nativen LHCII vorliegt, zu $\sim 90\%$ erfolgt wäre und daß in den Versuchen dieser Arbeit diese hohe ET auch für die gut gekoppelten Chlorophylle erreicht wurde. Grundlage dieser Hypothese ist die errechnete ET von 85% bei 77K (Kapitel 4.2.4.3), welche durch den Vergleich der maximalen Chla-Fluoreszenz bei An- und Abwesenheit eines Akzeptors ermittelt wurde. In dieser Bestimmung des Donorquenchings wurde der verstärkte Fluoreszenzanteil der Chlorophylle < 680 nm nicht mit einbezogen. Beruhte die Vergrößerung der Chl *a*-Halbwertsbreite auf der Anwesenheit schwach gekoppelter Chlorophylle, mußte auch bei 680 nm noch mit einer geringen Fluoreszenz dieser Pigmente gerechnet werden. Der Wegfall ihrer Emission würde das Donorquenching im LHCII-BTI-Konstrukt auf ca. 90% erhöhen.

Damit konnte durch ungekoppeltes Chla ein Verlust des maximal möglichen Energietransfers von maximal 14% erwartet werden, ein Energietransfer von 100% von Chla auf Maleimido-BTI wurde auf diese Weise höchst wahrscheinlich nicht maskiert.

Es konnte damit abschließend nicht nachgewiesen werden, ob die ET mit 70% bei 297K unterbewertet ist. Vermutlich spielten beide genannten Szenarien a und b eine Rolle, doch zu welchem Anteil konnte nicht bestimmt werden.

Es konnte aber trotzdem gezeigt werden, daß der Energietransfer im wesentlichen gerichtet ist und LHCII-BTI damit ein nutzbares biomimetisches Modell darstellt. Eine weitere Optimierung könnte unter Berücksichtigung beider vorgestellter Szenarien in zweifacher Hinsicht erreicht werden. So könnte der Hintransfer von Chla auf Maleimido-BTI stärker fokussiert werden, wenn sich τ des Farbstoffs deutlich verringerte (Szenario a). Dazu müßte Maleimido-BTI eine zusätzliche Möglichkeit der energetischen Relaxation nach Energieübertragung von Chla erhalten. Denkbar wäre eine Interaktion des Farbstoffs mit einem Elektronenakzeptor, so daß auf Maleimido-BTI übertragene Anregungsenergie über eine Oxidation abgegeben werden könnte. Eine Bindung von LHCII-BTI an TiO_2 -Oberflächen der Grätzelzelle wäre hier eine Option (vgl. Kapitel 7.3.4).

Des Weiteren wäre eine stärkere Abschirmung des Maleimido-BTI-Farbstoffs vom LHCII eine Möglichkeit, potentielle Einflußnahmen des Farbstoffs auf die Komplexstruktur zu unterbinden (Szenario b). So könnte eine Einbettung des Farbstoffs in eine Gelmatrix mögliche che-

mische Interaktionen mit dem Komplexprotein verhindern sowie eine potentielle Anlagerung des Farbstoffs an hydrophobe Peptidbereiche unterbinden.

NIR-Cy und IRD38 hätten vermutlich auch zur Erstellung biomimetischer Modelle genutzt werden können, wenn die in Kapitel 7.1 aufgeführten chemischen Probleme zu einer größeren Zufriedenheit gelöst worden wären. In einer ersten Abschätzung wurden auch hier ET von 60 - 70% errechnet. Szenario a (aus dem LHCII-Maleimido-BTI-Übergang) einer möglichen Maskierung eines noch effizienteren Energietransfers konnte ausgeschlossen werden, das R_0 für einen solchen Energierücktransfer lag bei null und damit auch die mögliche ET. Szenario b von teilweise entkoppeltem Chla konnte nicht untersucht werden. Die Messungen fanden, wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben, in Anwesenheit großer Mengen unmarkiertem LHCII statt, welche Änderungen im komplexinternen Energietransfer auf jeden Fall maskiert hätten.

Interessanter Weise konnte aus der ET und R_0 bei $\kappa^2 = 4$ für LHCII-BTI und LHCII-NIR-Cy ein nahezu identischer Abstand R zwischen Chla und Farbstoff errechnet werden.

$$R = R_0 [(1-ET)/ET]^{1/6} \text{ (Cantor und Schimmel, 1980)}$$

$R_{\text{Chla-Maleimido-BTI}}$ wurde mit 68 Å bestimmt, $R_{\text{Chla-NIR-Cy}}$ mit 63 Å. Wenn man davon ausgeht, daß die Konformation des N-terminus in allen LHCII-Farbstoff-Konstrukten gleich ist (vgl. dazu Kapitel 7.1.3), muß auch in jedem Fall von einem R in gleicher Höhe ausgegangen werden, da Maleimido-BTI und NIR-Cy an die selbe AS des LHCII banden. Dieser Sachverhalt weist darauf hin, daß κ^2 in beiden biomimetischen Modellen einen ähnlichen Wert einnimmt trotz der völlig verschiedenen chemischen Struktur der beiden Farbstoffe.

Für künftige Versuche mit biomimetischen Modellen aus LHCII und variierenden Farbstoffen könnte dies bedeuten, daß ein für ein System bestimmtes κ^2 auf andere Systeme übertragbar wäre. Eine Bestimmung von κ^2 zur genaueren Determinierung von R_0 und damit möglichen Konkretisierungen der Energietransfereffizienz sowie des molekularen Abstands zwischen Donor und Akzeptor bleibt jedoch nach wie vor dringlich.

Im Gegensatz zum LHCII-BTI- und LHCII-NIR-Cy-Konstrukt konnte bei LHCII-Cy5.5 nicht von einem größtenteils gerichteten Energietransfer auf den Farbstoff ausgegangen werden. Das R_0 für den Hin- und Rücktransfer war gleich groß (bei Annahme des maximalen ϵ_{Chla} zur Berechnung des R_0 für den Rücktransfer), ein Energietransfer in beide Richtungen damit potentiell gleich wahrscheinlich, geht man von einem Energietransfer im Picosekundenbereich aus (s.o.). τ von LHCII und Cy5.5 liegen im Nanosekundenbereich ($\tau_{\text{Cy5.5}} = 2$ ns, pers. Mitteilung von Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) und damit bei obiger Annahme weit über dem Zeitfenster für den Energietransfer.

Die in den Komplexen der Wildtypsequenz ermittelte ET von 35% (vgl. Kapitel 4.2.1.2) stellt daher nur die Quantifikation des apparenten Energietransfers dar. Eine absolute ET von 35% hätte bei einem R_0 von maximal 92 Å (vgl. Kapitel 4.1.3) zu einem R von maximal 103 Å geführt, was als nahezu unmöglich erachtet wird.

Da für LHCII-BTI- und LHCII-NIR-Cy-Konstrukte eine große Ähnlichkeit von κ^2 gefordert worden war, sollte dies gerade auch für LHCII-Cy5.5 gelten. Immerhin sind sich Cy5.5 und NIR-Cy strukturell sehr ähnlich. Ein R , welches bei gleichem κ^2 über 40% größer ist als in LHCII-BTI und LHCII-NIR-Cy, erscheint sehr unwahrscheinlich. Szenario a eines Energierücktransfers wird daher als Erklärung für die geringe ET favorisiert.

Unverständlich bleibt nach obigen Erklärungen zum Energietransfer bei 297K die errechnete ET von 68% bei 77K im selben Konstrukt. Zwar kam es durch eine Zunahme der spektralen Überlappung zwischen Chla-Emission und Cy5.5-Absorption hier zu einem Anstieg des ma-

ximal möglichen R_0 für den Übergang von Chla auf Cy5.5, doch galt das gleiche auch für den Energierücktransfer, ausgehend vom Farbstoff. Wieder wurden für R_0 beider energetischer Übergänge nahezu gleiche Werte ermittelt und damit ein Energietransfer in beiden Richtungen mit gleicher Effizienz möglich.

Eine potentielle, wenn auch völlig hypothetische Erklärung dieses Phänomens wäre eine deutliche Verminderung von τ des Cy5.5 im Tieftemperaturmeßsystem. Läge $\tau_{\text{Cy5.5}}$ bei 77K im Zeitfenster des energetischen Übergangs, wäre der Energietransfer auf den Farbstoff in großem Maße gerichtet, selbst wenn das R_0 für den energetischen Übergang in entgegengesetzter Richtung außerordentlich groß wäre. Leider gibt es bis dato weder experimentell noch aus der Literatur mögliche Hinweise auf die Korrektheit dieser Hypothese.

Die Bereitstellung einer zusätzlichen Relaxationsmöglichkeit für Cy5.5, wie es für das LHCII-BTI-Konstrukt vorgestellt wurde (s.o.), könnte LHCII-Cy5.5 trotz allem auch als biomimetisches Modell nutzbar werden lassen. Durch Zugabe eines potentiellen Elektronenakzeptors könnte τ des Farbstoffs herabgesetzt und der Energietransfer in einer Richtung fokussiert werden.

Neben einer Erhöhung der ET könnte auf diese Weise die Ähnlichkeit aller vorgestellten biomimetischen Modelle mit einem pflanzlichen Photosystem vergrößert werden. Im natürlichen System wird die Sonnenenergie nicht nur absorbiert und auf ein Reaktionszentrum gebündelt. Im Reaktionszentrum wird die Energie darüber hinaus zur Ladungstrennung verwendet und damit letztendlich zur Produktion von Reduktionsäquivalenten und ATP genutzt. Die in dieser Arbeit verwirklichten biomimetischen Modelle erfüllen nur die ersten beiden Vorgaben des pflanzlichen Systems. Lichtenergie wird absorbiert und auf den Energieakzeptor gebündelt. Bei einer nachfolgenden Elektronenabgabe des Farbstoffs wäre auch die dritte Vorgabe des pflanzlichen Systems erfüllt. Eine letztendliche Umwandlung der Sonnenenergie in nutzbare Energieformen könnte darüber hinaus durch eine stabile Ladungstrennung erreicht werden, wie sie in Kapitel 7.3 vorgestellt wird.

7.1.3 Der LHCII-N-terminus ragt nicht vollständig ausgestreckt weg vom Protein

Aus der ET des Übergangs von Chla auf Maleimido-BTI in LHCII-BTI-Komplexen wurde ein maximales R der beteiligten Chromophore von 68 Å ermittelt (vgl. Kapitel 7.1.2). Dieser Abstand kann nicht erreicht werden, wenn der N-terminus ausgestreckt vom Protein wegragt. Folgende theoretische Überlegungen führten zu diesem Schluß.

Für das N-terminal am stärksten verkürzte LHCII 261.9 (N-58) ist aus der kristallographischen Struktur von Kühlbrandt *et al.* (1994) ein minimaler Abstand der 1. AS zum nächst gelegenen Chla von 11,6 Å gezeigt worden (Chla1 nach der Terminologie von Kühlbrandt *et al.*, 1994). Die im Fall der LHCII-BTI-Konstrukte verwendete Proteinmutante besitzt einen 57 AS längeren N-terminalen Bereich und eine Kopplung des Farbstoffs an die 3. AS. Postuliert man nun eine nahezu vollständig gestreckte Aminosäurekette als N-terminus, so müßten zum Abstand von 11,6 Å ca. 193 Å dazu gerechnet werden ($55 \text{ AS} \times 3,5 \text{ Å}$, 3,5 Å ist der Abstand zweier AS in einer β -Faltblattstruktur, vgl. Stryer, 1995). Der Farbstoff wäre also über 200 Å vom nächsten Chlorophyll entfernt und die ET damit nahe 0%. Bei einer stärkeren Auffaltung der N-terminalen Proteinkette, wie es durch Helixbildung geschieht, müßte man immer noch von einem Abstand des Farbstoffs zum nächst gelegenen Chla von ~95 Å ($11,6 \text{ Å} + 83 \text{ Å}$) ausgehen (55 AS ergäben eine α -Helix mit ~15 Umdrehungen, was einer Gesamtlänge von 83 Å entspräche). Die ET läge immer noch im Bereich von nur 23% (bei Annahme des maximalen R_0 von 78 Å im LHCII-BTI-Konstrukt, sonst wäre die ET noch bedeutend kleiner). Damit

ergibt sich notwendigerweise die Vorlage einer Tertiärstruktur in diesem Bereich derart, daß der jeweilige Fluoreszenzfarbstoff im zeitlichen Mittel in eine größere Nähe zum pigmentierten Teil des LHCII kommt.

Hinweise in die gleiche Richtung liefern auch die Versuche mit den LHCII-Cy5.5-Konstrukten N-terminal verkürzter Proteinmutanten. Zwar kann in diesen Konstrukten nicht von einem gerichteten Energietransfer von Chla auf Cy5.5 ausgegangen werden, so daß aus der ET nicht auf potentielle R geschlossen werden darf (vgl. Kapitel 7.1.2). Doch kann der apparente Energietransfer in Abhängigkeit der Länge des N-terminus verglichen werden.

Während die Cy5.5-markierten Proteinmutanten 26l.9 (Δ N-58), Sca (Δ N-21) und 1h.19 (Δ N-11) eine ET von ca. 28% aufzeigten, wick die ET von D7f.3-Cy5.5 (Wildtypprotein) signifikant mit 35% davon ab. Zwei mögliche Szenarien ergeben sich hieraus.

In Szenario 1 variiert κ^2 in den einzelnen Mutanten durch eine veränderte Lage des Akzeptors zum komplexgebundenen Chla, so daß im Fall des Wildtypkomplexes eine deutlich günstigere Dipol-Dipol-Orientierung vorliegt als in allen anderen Mutanten.

Szenario 2 geht dagegen von einem nicht variierenden κ^2 aus. In diesem Fall muß das R zwischen Cy5.5 und Chla im Wildtypkomplex verringert sein gegenüber allen anderen Mutanten, um die höhere ET zu erklären.

Beide Szenarien stellen Extrema dar. So gibt es für den ersten Fall keine Hinweise darauf, daß κ^2 nur für das biomimetische Modell mit dem Wildtypprotein einen höheren Wert angenommen haben könnte, jedoch für die drei anderen Mutanten relativ konstant blieb (ET der drei verkürzten Mutanten war ungefähr gleich hoch). Im zweiten Fall ist es dagegen unwahrscheinlich, daß κ^2 immer konstant blieb, unabhängig von der N-terminalen Länge des Proteins. Vermutlich handelt es sich in der Realität um ein konzertiertes Ergebnis beider Phänomene, variierendem R und variierendem κ^2 , wobei eine Rückfaltung des N-terminus in Richtung des pigmentierten LHCII eine wahrscheinliche Option darstellt.

Für die noch deutlich geringere ET von LHCII-Cy5.5 der Mutante 26g.11 (N-61) von 23% konnte keine befriedigende Erklärung gefunden werden.

Ob der N-terminus eine starre Konformation einnimmt, oder aber eine gewisse Beweglichkeit inne hat, konnte in den Versuchen nicht überprüft werden. Die Experimente mit LHCII-IRD38 und LHCII-BTI zeigen zwar eine hohe Wahrscheinlichkeit eines gleichen κ^2 (für die Chla-Farbstoff-Interaktion) trotz verschiedener Farbstoffakzeptoren. Ob dies jedoch in Richtung einer Beweglichkeit des N-terminus und damit einer Einnahme eines gleichen mittleren κ^2 gedeutet werden kann, oder aber ob der N-terminus eine ganz starre Konformation einnimmt und jeden Farbstoff in die selbe Orientierung zwingt, kann nicht beantwortet werden. Hierzu sind einzelmolekulare Messungen notwendig, wie sie in Kapitel 7.2 vorgestellt sind.

Abschließend muß zu diesem Themengebiet natürlich gefragt werden, inwiefern möglicherweise die Farbstoffe selbst die Konformation des N-terminus beeinflussen haben und damit möglicherweise die gesamte Organisation des LHCII.

Spezifische, stabile Interaktionen von Farbstoffen mit bestimmten Proteindomänen werden ausgeschlossen. Durch Trypsinverdau konnte in allen LHCII-Farbstoff-Konstrukten der Energietransfer vom Chlorophyll auf den Energieakzeptor zum Erliegen gebracht werden. Dies könnte bei einer spezifischen sowie stabilen Interaktion von Protein und Farbstoff nicht erwartet werden. In diesem Fall würde ein Trypsinverdau zwar die kovalente Verknüpfung zwischen Farbstoff und Protein lösen, die Interaktion des Farbstoffs mit dem zum größten Teil proteasegeschützten Proteinbereich bliebe jedoch bestehen.

Unspezifische Interaktionen von Farbstoff und Protein können dagegen nicht vollständig ausgeschlossen werden, reduzieren sich aus folgenden Überlegungen heraus jedoch auf ein Minimum.

So konnte in Anwesenheit des Energieakzeptors keine tiefgreifende Störung des komplexinternen Energietransfers von Chlb nach Chla beobachtet werden (vgl. Kapitel 4.2.5). Lediglich ein kleiner Anstieg der Chlb-Fluoreszenz nach Chlb-Anregung war sichtbar und konnte in Richtung einer kleineren strukturellen Variation im Komplex gedeutet werden.

Etwas deutlicher wurden die Hinweise auf eine unspezifische Interaktion von Farbstoff und komplex gebundenem Chlorophyll in den LHCII-BTI-Komplexen bei 77K (vgl. Kapitel 7.1.2). Hier wurde eine Veränderung des Chla-Emissionsspektrums nach Energietransfer offensichtlich, die auf eine geringe Kopplung besonders kurzweilig absorbierender Chla im Rotlicht-Bereich hindeutete und einen potentiellen Energietransfer von ca. 90% auf 76% reduzierte. Ungekoppeltes Chla konnte also maximal zur Reduktion der ET um ca. 14% beigetragen haben, was wahrscheinlich den größtmöglichen Grad einer unspezifischen Interaktion von LHCII und Farbstoff widerspiegelt.

Gegen eine darüber hinaus gehende stärkere Interaktion des Farbstoffs mit dem Komplex spricht auch das sehr ähnliche spektroskopische Verhalten der LHCII-BTI- und LHCII-NIR-Cy-Komplexe. So werden für beide Komplexe ähnliche κ^2 -Werte postuliert, was bei unspezifischen Farbstoffinteraktionen mit beliebigen Proteinbereichen nicht erwartet werden könnte. Damit wurde gezeigt, daß eine reine Konformationsänderung des N-terminus durch die Anwesenheit der Fluoreszenzfarbstoffe kein wahrscheinliches Szenario darstellt. Unspezifische Interaktionen von Farbstoff und LHCII können zwar nicht ausgeschlossen werden, haben aber nur einen geringen Einfluß auf den komplexinternen Energietransfer.

Einen Einfluß der Farbstoffe auf die korrekte Proteinfaltung wird dagegen ausgeschlossen. Es konnten keine Störungen der Rekonstitution nachgewiesen werden. Die farbstoffmarkierten Komplexe wiesen die gleiche Stabilität auf wie unmarkiertes LHCII und zeigten nach Farbstoffelimination durch Trypsinverdau ein identisches spektroskopisches Verhalten.

Unerklärlich bleibt in diesem Zusammenhang jedoch das spektroskopische Verhalten von Maleimido-BTI im LHCII-BTI. So konnte eine Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute des Farbstoffs in Abhängigkeit einer variierenden Detergens- oder Lipidumgebung nur bei Bindung an das denaturierte Protein festgestellt werden. Die Fluoreszenzquantenausbeute im LHCII-BTI blieb unverändert (vgl. Kapitel 4.2.4.3). Dagegen verursachte eine Zugabe von Glycerin zu LHCII-Cy5.5 einen deutlichen bathochromen Shift in der Farbstoffemission. Cy5.5 war damit zugänglich für Veränderungen der wäßrigen Umgebung, Maleimido-BTI nicht. Ob dies auf eine veränderte Mizellenbildung um das sehr hydrophobe Maleimido-BTI zurückgeführt werden konnte, bleibt unklar. Eine Farbstoff-Farbstoff-Interaktion zweier LHCII-BTI-Komplexe konnte jedoch ausgeschlossen werden. So wurde in Aggregationen von Maleimido-BTI immer eine deutliche hypsochrome Verschiebung (>40 nm) in der Absorption detektiert, die in LHCII-BTI-Komplexen nicht auftrat. Die Farbstoff-Phenoxy-Gruppen schützten vermutlich auch in der Detergensumgebung sehr effizient vor einer Aneinanderlagerung der Maleimido-BTI-Moleküle.

7.1.4 Der Energietransfer im biomimetischen Modell ist ein Resonanztransfer

Wie in Kapitel 7.1.2 und 7.1.3 angedeutet, wurde für alle biomimetischen Modelle ein Energietransfer von Chla auf den angekoppelten Farbstoff nach Förster angenommen. Die Hinweise hierauf waren vielfältig und sollen im folgenden in Abgrenzung zu anderen Energietransfermöglichkeiten dargelegt werden.

Besonders intensiv wurde das LHCII-Cy5.5-Konstrukt untersucht. Hier wurde der Energietransfer sowohl über das Donorquenching als auch über die stimulierte Akzeptorfluoreszenz bestimmt und ähnliche Werte für die ET gefunden. Dies deutet darauf hin, daß hier keine Umgebungseffekte (Lösungsmittel, o.ä.) für eine Variation der Donor- oder Akzeptorquantenausbeute verantwortlich waren. Solche, von Energietransferprozessen unabhängigen Effekte hätten einen unterschiedlichen Einfluß auf die beteiligten Chromophore haben müssen, zumal Chla und Cy5.5 keinerlei strukturelle Ähnlichkeiten zueinander aufweisen. Auch die Versuche zum Trypsinverdau zur Elimination des Energieakzeptors aus dem System weisen in diese Richtung (vgl. Kapitel 7.1.5).

Darüber hinaus wurde in allen Messungen darauf geachtet, daß die optische Dichte der LHCII-Farbstoff-Konstrukte unter 0,1 lag, um eine potentielle Reabsorption zu minimieren. Triviale Energietransferprozesse sollten damit auch weitestgehend ausgeschlossen sein.

Ein Energietransfer nach Förster stellt sich damit als sehr wahrscheinlich heraus. Ein Energieübergang nach Dexter (vgl. Kapitel 1.2) konnte zwar nicht in allen Fällen komplett ausgeschlossen werden, doch erfolgt ein solcher energetischer Übergang nur bei Überlappung der Elektronenorbitale der beteiligten Chromophore und ist daher auf Donor-Akzeptor-Abstände bis 5 Å begrenzt.

Gerade für LHCII-Cy5.5-Konstrukte mit N-terminal verkürztem LHCII kann aus diesem Grund ein solcher Energietransfer komplett ausgeschlossen werden. Elektronenkristallographische Daten zeigen hier beispielweise für die Mutante 26l.9 (N-58) einen Abstand des N-terminus (und damit von Cy5.5) von 11,6 Å zum nächstgelegenen Chla. Für andere LHCII-Farbstoff-Konstrukte ist R nicht bekannt, doch kann auch hier ein Dextertransfer aus spektroskopischen Gründen als nicht wahrscheinlich erachtet werden. So treten bei diesem Energietransfermechanismus, bedingt durch die Orbitalüberlappung, neue Absorptionbanden im Donor-Akzeptor-Konstrukt zusätzlich zur singulären Donor- und Akzeptorabsorption auf, was aber in keinem Fall in dieser Arbeit detektiert wurde.

Schließlich konnte auch gezeigt werden, daß ein Elektronentransfer an Stelle eines reinen Energietransfers unwahrscheinlich ist. Erste Hinweise darauf lieferten die LHCII-Cy5.5-Konstrukte. Hier konnte eine gleichzeitige Zunahme der Akzeptorfluoreszenz bei Abnahme der Donorfluoreszenz detektiert werden (s.o.), was bei einem Elektronentransfer nicht zu erwarten gewesen wäre. Hier hätte zwar die Donorfluoreszenz abnehmen müssen, ein Anstieg der Akzeptorfluoreszenz wäre aber nicht in gleichem Maße erfolgt.

Anders sah es zunächst für das LHCII-BTI-Konstrukt aus. Hier konnte nach Chla-Anregung eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute des Donors detektiert werden aber nur ein geringer Farbstofffluoreszenzanstieg. Ein Elektronentransfer von Chla auf Maleimido-BTI wäre darüber hinaus aufgrund des gering negativen Redoxpotentials des Farbstoffs (Maleimido-BTI⁻ / Maleimido-BTI = - 0,83 V, Quante, 1995, in organischem Lösungsmittel bestimmt) vermutlich möglich gewesen. Von LHCII ist zwar kein Redoxpotential im isolierten Zustand bekannt, doch liegt das des „special pairs“ im Reaktionszentrum bei -1,1 V

(Chla/Chla⁺). Für LHCII könnte zwar ein etwas weniger negatives Redoxpotential erwartet werden, für einen Elektronentransfer auf den Farbstoff wäre es jedoch potentiell ausreichend. Spektroskopische Versuche mit Lhcb-1-BTI in An- und Abwesenheit vom Reduktionsmittel Na-Dithionit deuteten jedoch nicht in diese Richtung. So konnte gezeigt werden, daß das Emissionsspektrum von Maleimido-BTI nach Chla-Anregung im LHCII-BTI-Konstrukt dem des nicht reduzierten Maleimido-BTI des Lhcb-1-BTI entsprach (vgl. Kapitel 4.2.4.3), wogegen mit Na-Dithionit reduzierter Farbstoff längerwellig emittierte. Es ist daher sehr unwahrscheinlich, daß die Farbstoffemission im LHCII-BTI einem Farbstoff-Anion entstammte, wie es nach Elektronentransfer hätte gefordert werden müssen. Zudem konnten keinerlei Hinweise auf eine Elektronenweitergabe des reduzierten Farbstoffs an Sauerstoff gefunden werden, die eine Farbstoffemission in nicht reduzierter Form trotz eines vorangegangenen Elektronentransfers ausgehend von Chla begründet hätte.

Nach Determinierung der Fluoreszenzquantenausbeute von Maleimido-BTI in Detergensumgebung mit 3% wurde dann auch die geringe stimulierte Akzeptorfluoreszenz im LHCII-Farbstoff-Konstrukt ohne Annahme eines Elektronentransfers erklärbar. Eine Energietransferquantifizierung über die stimulierte Akzeptorfluoreszenz war aufgrund der geringen Farbstofffluoreszenz zwar fehlerbehaftet (Anpassungsabweichung der dekonvolvierten Kurven von 7%), erreichte jedoch eine vergleichbare ET von 65%.

Für alle biomimetischen Modelle wird aufgrund dieser Überlegungen von einem Energietransfer mit einer wesentlichen Lokalisation der Anregungsenergie auf einem Pigment ausgegangen und die Formeln zum Förstertransfer angewendet (vgl. Kapitel 7.1.2 und 7.1.3).

7.1.5 Der Resonanzenergietransfer wird am besten über das Donorquenching quantifiziert

Die Quantifizierung des RET erfolgt in der Regel am zuverlässigsten über die Veränderung der Donorfluoreszenz, was auch für die Experimente dieser Arbeit zum Teil gezeigt werden konnte (s.u.). Am genauesten kann der Energietransfer zwar über die Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer des Donors bestimmt werden, doch waren in dieser Arbeit hierfür die technischen Möglichkeiten limitierend. Alternativ wurde die Veränderung der Fluoreszenzquantenausbeute in Abhängigkeit eines möglichen Energietransfers untersucht. Dazu wurde in den Versuchen die Donorfluoreszenz eines LHCII-Farbstoff-Konstrukts mit der einer LHCII-Referenzprobe verglichen (vgl. Kapitel 3.3).

Der Vorteil dieser Methode der Energietransferbestimmung gegenüber einer Quantifizierung über die stimulierte Akzeptorfluoreszenz (s.u.) liegt in der direkten Überprüfbarkeit der Ursache des Donorquenchings.

So wurde die Abnahme der Chla-Quantenausbeute durch Energietransfer in den LHCII-Farbstoff-Konstrukten (vgl. LHCII-BTI, Kapitel 4.2.4.3 und LHCII-IRD38, Kapitel 4.2.3) über einen Trypsinverdau bewiesen. Vor Trypsinverdau war die Chla-Fluoreszenz im LHCII-Farbstoff-Komplex erniedrigt gegenüber farbstofffreiem LHCII gleicher Chlorophyllkonzentration, nach Proteasebehandlung war die Chla-Fluoreszenz beider Komplexe äquivalent.

Damit gelang für das Donorquenching eine Überprüfbarkeit der errechneten ET über die Angleichung der Chla-Fluoreszenzquantenausbeuten nach Elimination des Akzeptors aus dem Donor-Akzeptor-System.

Für LHCII-BTI-, LHCII-NIR-Cy- und LHCII-IRD38-Komplexe lag der einzige Meßfehler dieser Methode der ET-Quantifizierung in der nicht immer vollständigen Einstellung beider Proben (LHCII-Farbstoff und LHCII-Referenz) auf gleiche Chla-Absorption. Das Erreichen

identischer Chlorophyllabsorption war bei einer OD < 0,1 schwierig. Eine OD > 0,1 mußte jedoch vermieden werden, um in den fluorometrischen Experimenten Reabsorptionsphänomene zu unterbinden (vgl. Kapitel 7.1.4). Kleinste Verunreinigungen der Proben mit Fusseln führten zu Lichtstreuungen und damit zu Variationen in der Absorption. Nur eine stringente Zentrifugation der photometrisch zu bestimmenden Proben konnte dieses Problem nahezu eliminieren (der Fehler blieb auf dem 1%-Niveau).

Für LHCI-Cy5.5-Konstrukte war eine direkte Bestimmung der Verminderung der Fluoreszenzquantenausbeute des Donors in Anwesenheit des Akzeptors nicht möglich aufgrund der stark überlappenden Emission von Donor und Akzeptor. Eine Dekonvolution des Gesamt-emissionsspektrums in die Donor- und Akzeptorfluoreszenzanteile war notwendig und führte zu einem zusätzlichen Fehler in der ET-Berechnung. Da jedoch eine solche Dekonvolution auch für die ET-Bestimmung mittels stimulierter Akzeptorfluoreszenz notwendig war, stellt sie keinen spezifischen Nachteil des Donorquenchings dar.

Die Berechnung des Energietransfers über die stimulierte Akzeptorfluoreszenz erweist sich häufig als problematisch. So kann es beispielsweise zu photoinduzierten Variationen in der Fluoreszenzquantenausbeute des Akzeptors kommen. Die apparente ET verändert sich dann, ohne daß der eigentliche Energietransfer modifiziert wird.

Gerade für Cyaninfarbstoffe konnte dies von Widengren und Schwille (2000) nachgewiesen werden. Sie konnten bei Cy5 eine photoinduzierte Isomierierung in die cis-Form des Farbstoffs detektieren. Dies hatte zwar keinen Einfluß auf potentielle Energietransferprozesse, da die Farbstoffabsorption unverändert blieb, jedoch erlosch im cis-Isomer die Farbstofffluoreszenz nahezu vollständig. Eine Quantifizierung des Energietransfers über die stimulierte Akzeptorfluoreszenz hätte hier zu einer starken Unterschätzung der tatsächlichen ET geführt.

In den Versuchen dieser Arbeit wurde daher der Energietransfer über die stimulierte Akzeptorfluoreszenz nur bestimmt, wenn mittels Donorquenching im System eine vergleichbare ET gemessen worden war. Eine Quantifizierung des Energietransfers einzig aufgrund von Daten zur stimulierten Akzeptorfluoreszenz wurde nicht in Erwägung gezogen.

Darüber hinaus war die Bestimmung der ET mit Hilfe dieser Methode auch stärker Fehler behaftet. So ist für die Bestimmung des Energietransfers die Kenntnis der Quantenausbeuten von Donor und Akzeptor notwendig. Diese mußten in einigen Fällen erst in relativen Messungen bestimmt werden und führten damit zur Einführung eines Fehlers in das Meßsystem.

Für die LHCI-Cy5.5-Konstrukte stand damit, zusätzlich zum Fehler durch die Dekonvolution der Emissionsspektren, der oben genannte Fehler der photometrischen Anpassung im Donorquenching dem Fehler durch die relativ bestimmten Fluoreszenzquantenausbeuten gegenüber. Letzterer Fehler überwog dabei besonders für 77K-Messungen deutlich (vgl. Standardabweichungen Kapitel 4.1).

Eine sehr elegante Methode zur ET-Bestimmung über die stimulierte Akzeptorfluoreszenz stellt der Vergleich der Excitations- und Absorptionsspektren des Donor-Akzeptor-Konstrukts dar. Hierfür ist die Kenntnis der Fluoreszenzquantenausbeuten der beteiligten Chromophore nicht notwendig, zudem kann die gesamte Quantifizierung an einer Probe erfolgen. Eine Referenz ist nicht notwendig. Meßfehler konnten nur gerätebedingt auftreten (Excitation und Absorption nicht mit dem selben Meßgerät bestimmbar).

Da für eine solche Quantifizierungsmethode eine völlige Trennung der Donor- und Akzeptor-Absorption notwendig ist, kam dieses System nur für die LHCI-NIR-Cy und LHCI-IRD38-Konstrukte in Frage. Eine zuverlässige Quantifizierung der ET scheiterte hier jedoch an der zu geringen Fluorometer-Detektorsensitivität bei Wellenlängen >820 nm.

Daß in den Versuchen dieser Arbeit trotzdem die ET in den LHCI-Cy5.5-Komplexen häufig über die stimulierte Akzeptorfluoreszenz bestimmt wurde, hatte zwei Gründe. Zum einen

konnte gezeigt werden, daß sich die berechnete ET nicht von der über das Donorquenching ermittelten ET unterschied. Auf die Einstellung der LHCII-Cy5.5- und LHCII-Probe auf gleiche Chlorophyllabsorption, wie es für die Bestimmung der ET im Donorquenching notwendig ist, konnte verzichtet werden.

Zum zweiten wurde der nichtsystematische Fehler, wie er durch die Messung gegen eine LHCII-Referenz auftritt, vermieden und durch einen systematischen Fehler, wie er durch die Unkenntnis der präzisen Quantenausbeuten auftritt, ersetzt. Für einen relativen Vergleich der ET von LHCII-Cy5.5-Komplexen unterschiedlicher N-terminaler Länge war dies ein deutlicher Vorteil. Die Bestimmung der absoluten ET war hier weniger wichtig.

Die Etablierung eines Systems der ET-Bestimmung über das Donorquenching in einer einzelnen Probe konnte nicht zur Zufriedenheit erreicht werden. Ziel war es, die LHCII-Komplexe zu zerstören und damit das Donorquenching zu unterbinden. Es konnte jedoch keine Versuchsbedingung gefunden werden, unter der sich die Chla-Quantenausbeute nicht aufgrund von Umgebungsveränderungen (Hitze oder Detergens) erhöhte und damit wieder einen Meßfehler in die ET-Berechnung einbrachte.

7.2 Untersuchungen zum komplexinternen Energietransfer mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie

Um den komplexinternen Energietransfer des LHCII näher zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit einzelmolekülspektroskopische Versuche mit dem rekombinanten Komplex durchgeführt. Ziel war es, LHCII-Monomere und Trimere zu immobilisieren, um sie nachfolgend in einer Flüssigkeitszelle in wäßriger Umgebung spektroskopisch untersuchen zu können. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche sollten den Grundstein für eine Entschlüsselung der Chlorophyll-Dipolmomente im Komplex legen (vgl. Kapitel 7.2.4), aber darüber hinaus auch selbst Beiträge zur Determinierung der Energietransferprozesse liefern.

7.2.1 LHCII kann mit Hilfe der HRP an Glasoberflächen immobilisiert werden

7.2.1.1 LHCII-His6 immobilisiert selektiv über den His6-tag

Die Versuche aus Kapitel 5.1 verdeutlichen, daß es gelang, LHCII über den „His6-tag“ an HRP und damit an die Glasoberfläche zu binden. In Populationsmessungen am Fluoromax-2 wurde eine deutlich erhöhte Bindungseffizienz von LHCII-Monomeren der Mutante S3Ch (mit His6) gegenüber rekombinanten Komplexen der Wildtypsequenz detektiert. Ähnlich selektive Bindungen wurden in einzelmolekularen Untersuchungen an Monomeren und Trimeren der Mutante S3Ch gegenüber rekonstituierten Wildtyp-Monomeren bzw. nativen Trimeren nachgewiesen. Die Immobilisation war daher weder eine spontane Aggregation der Komplexe an die Glasoberfläche, noch ist es eine intrinsische Eigenschaft aller rekombinanten Proteine. Die LHCII-Bindung an das Glas kann nur durch die Interaktion der „His6-tag“-Sequenz mit dem Ni-NTA der HRP zustande gekommen sein.

Damit war es in den Versuchen möglich, LHCII in einer Detergensusgebung zu untersuchen, in der ihm noch einige Freiheitsgrade der Bewegung verblieben. Zwar wurde in jedem Fall der LHCII über den C-Terminus immobilisiert (vgl. AS-Sequenz Kapitel 2.3), doch ragten N-terminus und stromale Schleife in die Detergensusgebung der Flüssigkeitszelle. Von beiden Proteindomänen ist die Konformation unbekannt, möglicherweise sind diese Proteinbereiche nicht starr, strukturelle Änderungen, wie sie möglicherweise in der Thylakoidmembran auftreten können, wären auch in diesem Meßsystem zugelassen. Dies unterscheidet den neuen Versuchsansatz deutlich von vorherigen Experimenten mit LHCII-Komplexen, immobilisiert in einer PVA-Matrix (vgl. Tietz *et al.*, 2001). Hier mußte von einer Immobilisierung und Fixierung des gesamten Proteins ausgegangen werden.

Da über die Art der HRP-Bindung an die Glasoberfläche nichts bekannt war, konnte ähnlich den LHCII-Messungen in PVA, nicht per se von einer definierten Orientierung der LHCII-Komplexe ausgegangen werden. Bei einer Beschichtung der Glasoberfläche mit reinem Ni-NTA würde es (unter der Voraussetzung einer flächendeckenden Ni-NTA-Belegung) zur Ausrichtung der reaktiven Gruppen senkrecht zur Glasebene kommen und damit zu einer Bindung von LHCII mit der Symmetrieachse senkrecht zur Oberfläche.

Im Fall der HRP konnte eine senkrechte Ausrichtung des Ni-NTA zur Glasebene als fraglich erachtet werden (vgl. Abb. 1.12) und mußte experimentell überprüft werden (vgl. Kapitel 7.2.1.2). Zum einen besitzt HRP eine dreidimensionale Gestalt mit einem Molekulargewicht von 42 kDa, die Generierung einer ebenen Oberfläche nach Belegung mit diesem Protein kann

nicht erwartet werden. Zum anderen ist der Bindungsmodus der HRP an der Glasoberfläche unbekannt, bei einer zufälligen Orientierung der Proteinmoleküle würde es auch zu einer zufälligen Orientierung der Ni-NTA-Gruppen kommen.

7.2.1.2 LHCII-Trimere werden über HRP in einer Vorzugsrichtung immobilisiert

In Versuchen von Tietz *et al.* (2001) wurde an LHCII-Monomeren in PVA ein Polarisationsgrad von 1 und an LHCII-Trimeren einer von durchschnittlich 0,4 detektiert.

Für die LHCII-Monomere war dieses Ergebnis sehr erstaunlich, zeigt doch das Auftreten linearer Polarisation normalerweise die Emission eines singulären Dipols an. Im LHCII gibt es jedoch mehrere besonders langwellig absorbierende Chla, von welchen eine Fluoreszenzemission potentiell möglich ist (Connelly *et al.*, 1997, Pieper *et al.*, 1999).

Tietz *et al.* (2001) schlossen aus dem Auftreten linearer Fluoreszenzpolarisation auf die dominierende Fluoreszenz eines singulären Chla. Eine Emission mehrerer Chlorophylle gleicher Dipolorientierung im Komplex wurde als sehr unwahrscheinlich angesehen. Der Grund für die Dominanz eines einzelnen Chla wurde in einer besonders effizienten Löschung von Tripletzuständen gesehen. Chlorophyll kann im angeregten Singulettzustand durch „Intersystem crossing“ in den Tripletzustand übergehen und diesen bis in den Bereich von Millisekunden besetzen. Es kommt zum Auftreten von Phosphoreszenz, welche aufgrund der geringen Stärke der Lichtemission im Gegensatz zur Chlorophyllfluoreszenz einzelmolekular-spektroskopisch nicht detektiert werden kann. Existiert nun ein singuläres Chla mit einem deutlich geringeren Abstand zu einem Carotinoid als alle anderen Chlorophylle, würde dessen Tripletzustand durch Energietransfer auf das Carotinoid besonders effizient gelöscht. Eine Singulettanregung des betreffenden Chla wäre sehr schnell wieder möglich und damit auch das Auftreten von detektierbarer Fluoreszenz. Physiologisch wäre eine schnelle Löschung des Chla-Tripletzustands des langwellig absorbierenden Pigments sinnvoll, besteht doch für dieses Chlorophyll aufgrund der größten Fluoreszenzlebensdauer am stärksten die Gefahr des Übergangs in den Tripletzustand.

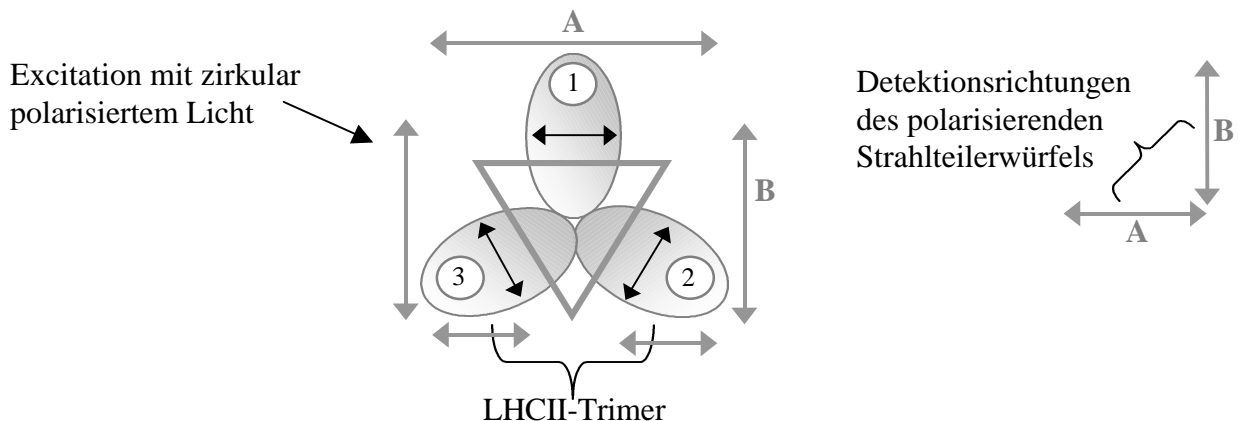
Versuche dieser Arbeit mit immobilisierten LHCII-Monomeren in einer Flüssigkeitszelle konnten die Beobachtungen von Tietz *et al.* (2001) in Bezug auf die lineare Polarisation der Chlorophyllfluoreszenz bestätigen. Auch hier wird von einem singulären Chla als dominierendem Fluorophor ausgegangen. Obiges Szenario einer effizienten Löschung von Tripletanregungszuständen wird favorisiert, wenngleich zwei weitere Möglichkeiten der Erklärung der linearen Fluoreszenzpolarisation nicht außer acht gelassen werden dürfen (vgl. auch Tietz *et al.*, 2001). So kann nicht in jedem Fall eine excitonische Kopplung mehrerer Chla ausgeschlossen werden, welche auch zur Emission von linear polarisiertem Licht führen würde. Tietz *et al.* (2000) konnten an LH2 bei Tieftemperaturmessungen aus diesem Grund das Auftreten linearer BChl-Emission detektieren (vgl. Kapitel 1.4.1). Überlegungen von van Amerongen und van Grondelle (2001) weisen zwar nicht in Richtung einer starken excitonischen Kopplung im LHCII (vgl. Kapitel 1.2), ein letztendlicher Beweis fehlt jedoch bislang. Darüber hinaus könnte auch eine Fluoreszenzemission durch ein singuläres Chlorophyll aufgrund eines völlig gerichteten Energietransfers auf das betreffende Pigment erfolgen. Hinweise auf einen derart gerichteten Förstertransfer gibt es aufgrund der starken spektralen Überlappung der Chromophore nicht, ausgeschlossen werden kann aber auch diese Erklärung des linear polarisierten Emissionslichts nicht völlig.

Insgesamt ist aber eine besonders effiziente Löschung von Chlorophylltriplettzuständen das wahrscheinlichste Szenario und wird für weitere Interpretationen des Energietransfers als Annahme verwendet.

Die Reduktion der Fluoreszenzpolarisierung in den LHCII-Trimeren wurde in den Versuchen von Tietz *et al.* (2001) ausgehend von der als sehr wahrscheinlich erachteten Emission eines singulären Chla im Monomer mit dem Auftreten mehrerer Chla-Emitter erklärt. Es wurde eine Fluoreszenz der drei Chla-Emitter der monomeren Untereinheiten postuliert. Dazu mußte gefordert werden, daß sich der Energietransfer im LHCII durch Zusammenlagerung der monomeren Untereinheiten zum Trimer nicht grundlegend änderte, also potentiell auch bei einer trimerübergreifenden Energiedistribution die Fähigkeit der Fluoreszenz bei jedem im Monomer emittierenden Chla erhalten blieb. Die Fluoreszenzemission könnte dann zu gleichen Wahrscheinlichkeiten von jedem der drei Chla aus erfolgen. In der Literatur gibt es starke Hinweise auf die Richtigkeit dieser Hypothese. So führten Gradinaru *et al.* (1998) einen direkten Vergleich des Trimer- und Monomereenergietransfers durch. Sie sahen kleinere Unterschiede im Bereich der Q_y -Absorption in 77K-Messungen, fanden aber in transienten Absorptionmessungen keine wesentlichen Unterschiede in den Energietransferraten der Monomere und Trimere. Pieper *et al.* (1999) fanden bei 2K darüber hinaus sogar direkte Hinweise auf drei emittierende Chla. So detektierten die Forscher im Bereich von 678 nm drei niedrigste Energiezustände, die möglicherweise einzelnen Chla verschiedener Monomeruntereinheiten zugeordnet werden könnten. Die Chlorophylle schienen nur schwach mit anderen Chlorophyllen gekoppelt zu sein.

Eine Fluoreszenzdepolarisation im Trimer wurde daher auch für die Versuche dieser Arbeit gefordert und mit dem Auftreten dreier Chla-Emitter als wahrscheinlichstes Szenario begründet. Bei einer Immobilisierung der rekombinanten LHCII-Trimere senkrecht zu deren Symmetrieebene wurde mit dem Auftreten völlig depolarisierten Lichts gerechnet. Abb. 7.1 verdeutlicht dies graphisch.

Abb. 7.1: Fluoreszenzpolarisierung im LHCII-Trimer



Im LHCII-Trimer geht man nach kristallographischen Untersuchungen von Kühlbrandt *et al.* (1994) von einer symmetrischen Anordnung der Monomeruntereinheiten im Trimer aus (C_3 -Symmetrie). Im LHCII-Modell ist dies in Form eines gleichseitigen Dreiecks angedeutet. Im Monomer existiert wahrscheinlich ein dominierender Chla-Fluorophor. Dessen Dipolmoment ist zwar nicht bekannt, doch muß davon ausgegangen werden, daß es sich in jeder Untereinheit um das gleiche Pigment handelt, so daß auch die einzelnen Dipolmomente zueinander ein gleichseitiges Dreieck bilden (dargestellt als schwarze Doppelpfeile). Hier wurde ein Dipolmoment willkürlich festgelegt, was aber kein Einfluß auf das Ergebnis hat. Die grauen Pfeile stellen die detektierbaren Polarisationsrichtungen des Strahlteilerwürfels dar, ihre Länge symbolisiert ihren Anteil an der Gesamtfluoreszenz. Im Monomer 1 wird ausschließlich Fluoreszenz der Polarisationsrichtung A detektiert, in Monomer 2 und 3 sind es Anteile beider Richtungen (A und B). In der Summe ist der Anteil aus Polarisationsrichtung A und B damit gleich, d.h. beide Photodioden detektieren die gleiche Fluoreszenzintensität. Die Trimere erscheinen unpolarisiert in ihrem Emissionsverhalten.

Bei einer auf dieser Weise orientierten Immobilisation von LHCII müßte mit einer Detektion gleicher Fluoreszenzanteile an beiden Photodioden gerechnet werden (zum Meßaufbau vgl. Kapitel 3.5).

Ausgehend von diesem Postulat wurde die orientierte Immobilisierung von LHCII-Trimeren an HRP-beschichteten Oberflächen überprüft (vgl. Kapitel 7.2.1.2). Ein Polarisationsgrad von 0 - 0,2 (vgl. Kapitel 5.2.1) entsprach den Erwartungen völlig. 72% aller LHCII-Trimere emittierten unpolarisiertes Licht. Die LHCII-Immobilisation auf HRP-beschichteten Glasplatten hatte sehr wahrscheinlich zur Orientierung der Komplexe mit ihrer Symmetrieachse senkrecht zur Oberfläche geführt. Weder die dreidimensionale Struktur der HRP noch die möglicherweise nicht senkrecht zur Glasoberfläche orientierten Ni-NTA-Gruppen hatten einen bedeutenden Einfluß auf die Immobilisierungsrichtung des LHCII. Damit ragten bei den LHCII-Vermessungen die LHCII-N-termini in den Detergenspuffer der Flüssigkeitszelle, die C-Termini interagierten über den „His6-tag“ mit der Ni-NTA-Oberfläche.

In weiteren Versuchen können vermutlich auch andere Komplexorientierungen durch die Variation der Lokalisation des „His6-tags“ im Apoprotein erreicht werden. Denkbar wäre z.B. eine Komplexdrehung um 180° durch eine LHCII-Bindung über den N-terminus.

Eine orientierte Immobilisierung von LHCII-Monomeren wird dagegen schwieriger zu erreichen sein. Im Trimer erfolgt die orientierte Immobilisation über drei „His6-tags“, die aufgrund der C3-Symmetrie des Komplexes (vgl. Abb. 7.1) wahrscheinlich im 120° Winkel zueinander liegen. Im Monomer erfolgt die Immobilisation des Komplexes dagegen nur über einen „His6-tag“. Eine Variation der Komplexorientierung ist potentiell in einem Winkel bis zu 180° möglich. Ein Einführen weiterer Histidylgruppen in LHCII-Schleifenregionen könnte aber zukünftig die Freiheitsgrade in der Komplexbewegung deutlich einschränken.

Insgesamt wurde mit diesen Versuchen gezeigt, daß eine orientierte Immobilisation von LHCII möglich ist, wenn auch nicht über elektrostatische Anziehungskräfte wie in anderen Chromophorensystemen (vgl. Kapitel 1.4.1). Neben der Immobilisation mittels HRP wurde kürzlich von Qiagen (Hilden) eine weitere Möglichkeit zur Belegung von Oberflächen mit Ni-NTA vorgestellt. Dabei wird eine Glasfläche zunächst silanisiert und daran anschließend Ni-NTA kovalent gebunden (Adachi *et al.*, 2000). Bei dieser Oberfläche kann von einer senkrechten Orientierung der Ni-NTA-Gruppen zur Glasoberfläche ausgegangen werden. Nutzbar wäre eine solch derivatisierte Oberfläche möglicherweise, wenn es mit Hilfe der HRP nicht gelingt, LHCII-Monomere orientiert zu immobilisieren, oder aber sich HRP für 2K-Experimente aus anderen Gründen als ungeeignet erweist.

7.2.2 Der Energietransferweg im LHCII-Monomer ist nicht fest determiniert

Es konnte in allen Versuchen im LHCII-Monomer nur eine Emission von linear polarisiertem Licht detektiert werden. Dies wurde auf die Fluoreszenz eines singulären Chla im Komplex zurückgeführt (vgl. Kapitel 7.2.1.2). Es konnte darüber hinaus auch gezeigt werden, daß sich die Polarisationsrichtung des emittierten Lichts bei Raumtemperatur in distinkten Schritten über die Zeit änderte. Es handelte sich dabei um keine spezifische Eigenschaft der rekombinanten Komplexe, native LHCII-Monomere zeigten ein äquivalentes Polarisationsverhalten (pers. Mitteilung von U.Gerken).

Zwei mögliche Erklärungen dieses Phänomens sollen an dieser Stelle vorgestellt werden. Zum einen könnte es im LHCII über einen Zeitraum von Sekunden bis Minuten hinweg zu einer

Drehung des emittierenden Chla kommen. Damit würde sich die Dipolorientierung ändern und somit auch die Polarisationsrichtung des emittierten Lichts. Die kristallographischen Daten geben jedoch keine Hinweise auf die Richtigkeit dieser Hypothese. Für Polarisations-sprünge, wie sie in Abb. 5.4 dargestellt sind, wären Chlorophylldrehungen von nahezu 90° erforderlich und das innerhalb eines Zeitraums von 60 sec. Besonders der lange Phytolrest würde eine solche Pigmentbewegung in der dicht gepackten Proteinmatrix sehr erschweren. Deshalb wurde diese Erklärungsmöglichkeit der Variation der Fluoreszenzpolarisationsrichtung als sehr unwahrscheinlich erachtet. Ganz auszuschließen ist sie jedoch nicht, da Furuichi *et al.* (2000) in ihren Versuchen eine Chla-Bewegung im LHCII detektieren konnten.

Eine Drehung des gesamten Komplexes, welche notwendigerweise auch zu einer Änderung der Chlorophyllorientierung führen würde, kann nahezu ausgeschlossen werden. LHCII, immobilisiert in PVA, zeigte die gleichen Polarisations-sprünge in der Emission (pers. Mitteilung von U.Gerken) trotz der Einbettung in die Polymermatrix.

Eine zweite Möglichkeit der Interpretation der Polarisations-sprünge wird präferiert. So könnten proteindynamische Ereignisse für eine Variation in der Polarisationsrichtung verantwortlich sein. Unter Proteindynamik versteht man das Phänomen, daß selbst hoch kompakte Proteinsysteme keine starre Struktur besitzen, sondern mehrere nahezu isoenergetische Konformationen einnehmen können. Solche dynamischen Prozesse wurden photoinduziert schon an vielen Pigment-Protein-Komplexen über eine spektrale Diffusion der Chlorophyllfluoreszenz bei tiefen Temperaturen nachgewiesen (z.B. für LH1 von Störkel *et al.*, 1998; für PSII von den Hartog *et al.*, 1999). Auch an LHCII wurde dieses Phänomen detektiert (Tietz *et al.*, 2001). So konnte in einzelmolekularen Untersuchungen bei 2K über einen Zeitraum von einigen Sekunden eine Variation des Emissionsmaximums einzelner Komplexe von bis zu 4 nm nachgewiesen werden. Zwischen verschiedenen Komplexen wurden Fluoreszenz-sprünge bis zu 10 nm gezeigt. Die spektrale Diffusion war abhängig von der Anregungsleistung und der Belichtungszeit, mußte also photoinduziert sein. Durch die Lichtanregung kam es vermutlich zu einer Variation in der Proteinumgebung des emittierenden Pigments, was zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums führte.

Wenn solche proteindynamischen Prozesse zu einer spektralen Emissionsverschiebung führen können, ist auch eine Veränderung der Fluoreszenzpolarisierung ein wahrscheinliches Szenario. Durch kleinere Änderungen in der Proteinkonformation könnte es zu einer stärkeren Annäherung eines Chla an ein Carotinoid kommen, so daß eine Auslöschung möglicher Tripletzustände besonders effizient erfolgen würde (vgl. Kapitel 7.2.1.2). Das betreffende Chla könnte dominierend emittieren. Nach einigen Sekunden könnte durch ein erneutes proteindynamisches Ereignis ein anderes Chla eine bessere Löschung von Tripletzuständen erfahren und vorwiegend fluoreszieren. Die Polarisationsrichtung der Fluoreszenzemission würde sich in der Folge ändern.

7.2.3 Im LHCII kommt es zur Fluoreszenzlöschung durch die Bildung eines sog. trap state

An LHCII-Monomeren konnte sowohl in den Experimenten von Tietz *et al.* (2001) in PVA als auch in den Messungen dieser Arbeit eine Auslöschung der Chlorophyllfluoreszenz nach einigen Sekunden der Lichtemission in einem distinkten Schritt nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 5.2.2). Erklärt wird dieses Phänomen am plausibelsten über die Generierung eines „trap state“. Ein „trap state“ wird meist durch ein Chlorophyllderivat gebildet, welches im angeregten Zustand einen geringeren Energiegehalt als alle übrigen Pigmente besitzt und strahlungslos relaxieren kann. Da der Energietransfer innerhalb des LHCII im Picosekunden-

bereich erfolgt (vgl. Kapitel 1.2), die Fluoreszenzlebensdauer des LHCII jedoch im Nanosekundenbereich liegt (Schödel *et al.*, 1998), wird bei Vorlage eines solchen „trap state“ die gesamte Anregungsenergie auf dieses Pigment übertragen, die Fluoreszenzquantenausbeute wird null. Wu *et al.* (1996) erklärten das Bleichverhalten von B-Phycocerythrin auf dieselbe Weise. B-Phycocerythrin ist ein bakterielles Lichtsammlersystem und stellt ein Protein mit 34 Chromophoren dar. In Raumtemperaturmessungen wurde auch an diesem Komplex ein Bleichen in einem distinkten Schritt gemessen und der Bildung eines „trap state“ zugeschrieben.

An LHCII-Trimeren konnte in den Versuchen dieser Arbeit in den meisten Fällen dasselbe Bleichverhalten in einem distinkten Schritt gezeigt werden. Offenbar kam es auch hier zur Bildung eines „trap state“. Da der Energietransfer innerhalb des gesamten Trimers immer noch im Picosekundenbereich liegt (10-100 ps, van Amerongen und van Grondelle, 2001) muß eine komplette Fluoreszenzlöschung bei Anwesenheit eines solchen Chlorophyllderivats gefordert werden.

Damit standen diese Versuchsergebnisse im Widerspruch zu den publizierten Daten von Tietz *et al.* (2001). Hier war in vielen Fällen an nativen Trimeren in PVA eine Abnahme der Chlorophyllfluoreszenz über die Zeit in drei distinkten Schritten nachgewiesen worden. Man hatte dieses Phänomen zwar auch über das Auftreten von Chlorophyllderivaten erklärt, forderte aber für diese Pigmente, daß sie kein besonders niedriges Energieniveau im LHCII einnehmen und damit keinen „trap state“ bildeten. So müßten diese Chlorophyllderivate zwar auch die Anregungsenergie strahlungslos abgeben, doch dürfte auf sie nicht die gesamte Anregungsenergie eines Trimers übertragen werden. Grundlage dieser Hypothese ist das Postulat von Gradinaru *et al.* (1998), daß der Energietransfer im LHCII-Trimer zunächst im Subpicosekundenbereich auf der monomeren Untereinheit stattfindet und erst danach global über das gesamte Trimer erfolgt. Chlorophyllderivate, welche nicht das energetisch geringste Niveau im Komplex einnehmen, würden dann zwar in den Energietransfer des Monomers mit einbezogen, könnten aber nicht durch den Energietransfer einer benachbarten monomeren Untereinheit eine Anregung erfahren. Ein selektives Bleichen einzelner Monomere wäre die Folge. Da in den Versuchen von Tietz *et al.* (2001) das Auftreten linearer Polarisation vor dem letzten Bleichschritt detektiert wurde, wie es für LHCII-Monomere typisch ist, wurde diese Hypothese von den Autoren als wahrscheinlich angesehen.

Es bleibt jedoch die Frage, warum es in den Versuchen dieser Arbeit sehr wahrscheinlich zur Bildung von „trap states“ im LHCII kam, diese in Experimenten von Tietz *et al.* (2001) jedoch ausgeschlossen werden mußten. Native Komplexe (aus der AG Paulsen) in PVA zeigten auch ein einstufiges Bleichen. Eine Variation im Bleichverhalten aufgrund unterschiedlicher Meßbedingungen oder aufgrund der Verwendung von rekombinanten versus nativen Komplexen konnte damit ausgeschlossen werden.

Native Trimere der AG Paulsen in PVA differierten damit in ihren spektroskopischen Eigenschaften von denen der nativen Trimere von Tietz *et al.* (2001, es handelte sich hierbei um eine Präparation von Schubert, Humboldt-Universität Berlin). Beide Trimerisolationen wurden nach dem selben Protokoll hergestellt (Krupa *et al.*, 1987). Trotzdem ist eine Variation in der LHCII-Aufbereitung die wahrscheinlichste Ursache für die differierenden Modi im Bleichverhalten der Chlorophylle. Ein mögliches Szenario, welches das unterschiedliche Bleichverhalten erklären könnte, wäre die Variation der eingesetzten Trimere im Kopplungsgrad der monomeren Untereinheiten. Pieper *et al.* (1999) bestimmte die Kopplungsstärke zwischen den monomeren Untereinheiten mit 5 cm^{-1} . Bei einem minimalen Chlorophyllabstand verschiedener monomere Untereinheiten von $\sim 20 \text{ \AA}$ ist damit ein Energietransfer in der Größenordnung von 10 ps monomerübergreifend möglich (Visser *et al.*, 1996). Nur eine deutlich

geringere Kopplungsstärke ($< 1 \text{ cm}^{-1}$) könnte den Energietransfer in den Bereich von Nanosekunden bringen, so daß die Fluoreszenzlebensdauer des emittierenden Chla geringer wäre als die Energietransferzeit und damit ein Energietransfer trimerübergreifend nicht mehr erfolgen würde. Dazu müßte jedoch ein größerer räumlicher Abstand zwischen den einzelnen Untereinheiten gefordert werden, worauf bislang keine Hinweise gefunden wurden. Vermutlich könnte ein direkter Vergleich der beiden Trimerpräparationen Aufschluß über mögliche strukturelle Unterschiede geben. Es könnte beispielsweise auch sein, daß durch die beiden Präparationen Komplexe unterschiedlicher Pigmentzusammensetzung hergestellt wurden. Ruban *et al.* (1999) detektierte z.B. mit Hilfe variierender Isolationsmethoden einen unterschiedlichen Violaxanthin-Gehalt der LHCII-Komplexe. Möglicherweise sind noch weitere Pigmente in ihrer Quantität im Komplex aufbereitungsabhängig und könnten zu unterschiedlichem Chlorophyllbleichverhalten führen. Am ehesten würden diese Unterschiede in Vergleichsmessungen mittels Pigment-HPLC, CD- und Fluoreszenzspektroskopie zu Tage treten. Weitere potentiell aufreinigungabhängige Variationen könnte der Phosphatidylglycerolgehalt im Trimer darstellen. Hier würde sich eine vergleichende Lipidquantifizierung anbieten.

Die Bildung eines „trap state“ war in den Versuchen dieser Arbeit häufig reversibel. Entsprechende Experimente wurden an LHCII-Trimeren durchgeführt (vgl. Kapitel 5.2.2). Nach einem Chlorophyllbleichen in einem distinkten Schritt kam es einige Sekunden später zu einem Wiederanstieg der Fluoreszenz in ebenso abrupter Weise. Eine mögliche Erklärung dieses auch als „random telegraph“-Signal bekannten Phänomens ist das Auftreten von reversiblen „trap states“. Bopp *et al.* (1997) entdeckten ähnliches an LH2-Komplexen. Hier kam es in zwei Dritteln aller Fälle zu einem reversiblen Bleichen der Komplexe. Bopp *et al.* (1997) diskutierten in diesem Zusammenhang die Ausbildung von Bakteriochlorophyll-Radikalkationen als mögliche Chromophorderivate, die als „trap state“ fungieren könnten. Annihilationsprozesse würden aber in gleicher Weise die Beobachtungen erklären. So könnten beispielsweise angeregte Bakteriochlorophyllsingulettzustände durch Carotinoidtriplettzustände ausgelöscht werden.

Für die LHCII-Trimere könnten die Postulate von Bopp *et al.* (1997) in gleicher Weise gelten, eine eindeutige Erklärung der Herkunft der „trap states“ ist jedoch noch offen.

7.2.4 Zukünftige einzelmolekulare Fragestellungen am LHCII

Nachdem es in dieser Arbeit gelungen ist, LHCII orientiert zu immobilisieren und darüber hinaus auch neue Einblicke in komplexinterne Energietransferprozesse gewonnen werden konnten, schließen sich einige Fragestellungen für die Zukunft an.

So könnten die Energietransferprozesse in den biomimetischen Modellen in ähnlicher Weise näher charakterisiert werden, wie es Ishii *et al.* (1999) an Cyaninfarbstoff-markierten Troponomyosin-Molekülen getan hat. Stellt beispielsweise eine Energietransfereffizienz von Chla auf BTI von 70% einen Durchschnittswert in der Population dar oder haben alle Komplexe die selbe Transfereffizienz? Rückschlüsse auf mögliche Konformationszustände des N-terminus könnten hieraus gezogen werden. Ähnliche Informationen könnten auch die LHCII-IRD38-Konstrukte geben. So könnte IRD38 selektiv angeregt und am immobilisierten Komplex die Fluoreszenzpolariation des Farbstoffs über die Zeit analysiert werden. Der Grad der Beweglichkeit des N-terminus wäre auf diese Weise erforschbar. Erste Versuche wurden bereits durchgeführt, zeigten aber eine hohe Photosensibilität von IRD38. Schon nach wenigen Se-

kunden trat ein irreversibles Bleichen auf. Möglicherweise müssen daher andere LHCII-Farbstoff-Konstrukte zur Bearbeitung dieser Fragestellung eingesetzt werden.

Gelingt es jedoch, ein geeignetes LHCII-Farbstoff-System zu finden, wären über den N-terminus hinaus weitere Beiträge zur Determinierung der Proteinstruktur möglich. So könnte die Beweglichkeit aller Schleifenregionen überprüft bzw. unterschiedliche Schleifenkonformere über variierende Energietransfereffizienzen von Chla auf, an diese Proteindomänen gekoppelte, Farbstoffe untersucht werden.

Eine sehr elementare Fragestellung könnte auch in näherer Zukunft bearbeitet werden, die Frage nach den Übergangsdipolmomenten der Chlorophylle im LHCII. Angestrebt sind hierfür 2K-Excitationsspektren mit immobilisierten Monomeren und LHCII-Farbstoff-Konstrukten. Es wird hierfür zunächst notwendig sein, die orientierte Immobilisation der Monomere in ähnlicher Weise wie für die Trimere zu determinieren (vgl. 7.2.1.2).

Bei 2K sollte es darauffolgend möglich sein, die Beiträge einzelner Chlorophylle zur langwelligsten Chlorophyllfluoreszenz in singulären Komplexen zu entschlüsseln. Aussagen über die Orientierung der Pigmente würden über die selektive Excitationen der Chlorophylle mit Licht unterschiedlicher Polarisationsrichtungen möglich. LHCII-Farbstoff-Konstrukte könnten in diesem Zusammenhang dazu dienen, die Übergangsdipolmomente der längstwellig absorbierenden Chla zu entschlüsseln. In LHCII-Excitationsspektren würde die Fluoreszenzdetektion bei eben diesen Chlorophyllen erfolgen, eine selektive Excitation dieser Pigmente wäre schwierig. In den LHCII-Farbstoff-Konstrukten dagegen könnte die Fluoreszenzdetektion in der Farbstoffbande erfolgen, die Dipolmomente der längstwellig absorbierenden Chla wären erforschbar. Erforderlich wäre hierfür ein sehr effizienter Energietransfer von den Chlorophyllen auf den Farbstoff. LHCII-BTI-Konstrukte könnten daher möglicherweise genutzt werden.

Um die so entschlüsselten Dipolmomente dann auch räumlich den verschiedenen Pigmenten zuzuordnen, werden 2K-Excitationsspektren mit Punktmutanten erforderlich sein (vgl. Kapitel 1.1.2). Geht durch die Punktmutation eine Pigmentbindestelle verloren, könnte über den Ausfall einer Excitationsbande das Dipolmoment eines definierten Chlorophylls bestimmt werden. Vermutlich wird aber eine Entschlüsselung der Dipolmomente nur in einer Kombination vieler spektroskopischer Untersuchungen an Punktmutanten möglich sein, da bislang in den wenigsten Fällen ein Aminosäureaustausch auf dem Protein zur Deletion einer singulären Pigmentbindestelle geführt hat. Meistens kam es zum Verlust mehrerer Pigmente (vgl. Yang *et al.*, 1999).

7.3 Studien zur technischen Nutzbarkeit der Lichtsammelleffizienz von LHCII

Es wurden in dieser Arbeit erste Studien zur technischen Nutzbarkeit der Lichtsammelleffizienz des LHCII durchgeführt. Angestrebt wurde eine Verwendung der absorbierten Lichtenergie zur Stromgewinnung. Daher bestand das vorrangige Ziel darin, LHCII auf der Halbleitermatrix TiO_2 einer Grätzelzelle (vgl. Kapitel 1.4.2) zu immobilisieren. Der Lichtsammelkomplex sollte der Lichtabsorption und möglicherweise auch der Elektroneninjektion in das Leitungsband des Halbleiters dienen. Es sollte besonders die hochgeordnete, dreidimensionale Anordnung der Chromophore in der Proteinmatrix genutzt werden, um die Sonnenenergie zu einem hohen Prozentsatz absorbieren und für eine Ladungstrennung nutzen zu können.

Dazu wurde LHCII aus Lhcb-1 rückgefaltet, über einer HAP-Säule von SDS gereinigt und nach weiteren Waschschritten auf TiO_2 immobilisiert.

7.3.1 HAP interagiert über ionische Wechselwirkungen mit LHCII

Um eine effiziente Bindung von LHCII an TiO_2 zu ermöglichen, wurden die Komplexe auf einer HAP-Säule von SDS gereinigt (vgl. auch Kapitel 7.3.2). Es zeigte sich, daß LHCII der Proteinmutante Lys6 deutlich besser auf der HAP-Matrix immobilisierte als das Wildtypprotein. Da sich beide Proteinvarianten im wesentlichen nur über eine N-proximale Häufung von sechs Lysinen unterscheiden (vgl. Kapitel 2.3), wurde eine Proteinimmobilisation an HAP über diese AS gefolgert.

Wie schon in Kapitel 6.2 beschrieben, gibt es generell zwei Möglichkeiten der Proteinbindung an HAP, zum einen werden ionische Wechselwirkungen zwischen Protein-Aminogruppen und HAP-Phosphatgruppen dafür verantwortlich gemacht, zum anderen können auch die Protein-Carboxylgruppen von den HAP- Ca^{2+} -Ionen komplexiert werden (Lottspeich und Zorbas, 1998).

LHCII mußte nach obigen Ergebnissen im wesentlichen über ionische Wechselwirkungen mit HAP interagiert haben. Die An- oder Abwesenheit von sechs Lysinen hätte keinen direkten Einfluß auf eine mögliche Proteinkomplexierung über Carboxylgruppen gehabt. Komplexbildungen können damit zwar als zusätzliche Möglichkeit einer Interaktion nicht ausgeschlossen werden, spielen aber eine untergeordnete Rolle. Eine Immobilisation von LHCII des Wildtypproteins hätte sonst mit größerer Effizienz erfolgen müssen.

Gleiche Ergebnisse wurden auch von Aizawa *et al.* (1998) für eine Lysozymbindung an HAP gefunden. In Versuchen dieser Publikation wurden Proteinmutanten mit AS-Austauschen von Lysin oder Arginin gegen Alanin hergestellt und an HAP immobilisiert. In den meisten Fällen wurde durch den Wegfall einer Aminogruppe die HAP-Bindung verringert. Damit konnte gezeigt werden, daß die Proteinimmobilisation durch Aminogruppen in starkem Maße gefördert wird.

Für weitere LHCII-Immobilisationen an TiO_2 bleibt zu untersuchen, ob eine SDS-Abreicherung des rekonstituierten Komplex über eine HAP-Säule auch mit anderen Proteinmutanten erfolgen kann. Möglicherweise reicht auch die Basizität des „His6-tags“ zu einer effizienten Interaktion mit den HAP-Phosphatgruppen aus, so daß mehrere schon in der AG Paulsen etablierte Mutanten für derartige Versuche genutzt werden könnten.

7.3.2 LHCII bindet als intakter Komplex an TiO₂

Erste erfolgreiche Versuche zur Proteinimmobilisation an TiO₂ wurden von J.Durrant, durchgeführt (Topoglidis *et al.*, 2000). Ihm gelang beispielsweise die Bindung eines Fe-Cytochroms an die Halbleitermatrix. Er konnte sogar eine elektrische Interaktion des Cytochroms mit TiO₂ detektieren. Nach Anlegen einer Spannung wurde eine Änderung des Redoxzustands des Eisenzentralatoms der prostetischen Gruppe nachgewiesen.

Alle bislang von J.Durrant untersuchten Proteinbindungen an den Halbleiter erfolgten jedoch mit löslichem Protein, weshalb der Einfluß von Detergentien von ihm nicht erforscht wurde. Detergentien stellten in den Versuchen dieser Arbeit einen wesentlichen Unsicherheitsfaktor bezüglich einer erfolgreichen Protein-Immobilisation auf TiO₂ dar. Eine Bindung von Membranproteinen auf den Halbleiter war bis dato noch nicht nachgewiesen worden.

Erste Versuche mit LHCII machten deutlich, daß die Anwesenheit negativer Ladungen am Protein, seien sie bedingt durch eine Farbstoffkopplung (Cy5.5 mit vier Sulfonylgruppen) oder durch Anwesenheit des anionischen Detergens SDS, die Proteinbindung an den Halbleiter stark herabsetzten. Dieser Befund war konsistent mit der Vermutung Topoglidis (1998), daß Proteine vermutlich durch elektrostatische Interaktionen über die positiv geladenen Lysin- oder/und Argininreste an TiO₂ binden. Die Anwesenheit der negativen Gruppen von Farbstoff oder Detergens wirkte offenbar im Versuch inhibitorisch auf die Immobilisation (vgl. dazu Kapitel 7.3.3).

Nach SDS-Abreicherung über eine HAP-Säule gelang am unmarkierten LHCII eine Bindung an TiO₂. Versuche zur Komplexstabilität bewiesen dabei die Intaktheit des immobilisierten LHCII über einen effizienten komplexinternen Energietransfer von Chlb nach Chla (vgl. Kapitel 6.3.2).

Erste Quantifizierungen der an TiO₂ gebundenen LHCII-Menge zeigten Beladungsdichten von 0,03 nmol/cm² (beobachtet an TiO₂-beschichteten Objektträgern). Rechnet man, bedingt durch die Porosität der TiO₂-Matrix, eine Oberflächenvergrößerung um den Faktor 1000 ein, bedeutete dies ein Platzangebot von ca. 5500 nm² pro LHCII-Molekül (vgl. Kapitel 1.4.2). Der Faktor zur Oberflächenvergrößerung ergab sich als Mittelwert aus den Experimenten von O'Regan und Grätzel (1991) und Kay und Grätzel (1993) zur maximal erreichbaren Farbstoffbelegung des Halbleiters. So wurde in einem Fall an 15 nm großen, kugelförmigen TiO₂-Partikeln einer 10 µm dicken Halbleiterbeschichtung über die gebundene Farbstoffmenge pro Flächeneinheit eine Oberflächenvergrößerung um 780 ermittelt. Im zweiten Fall wurde eine Vergrößerung um den Faktor 1100 an 25 nm großen Partikeln bei einer 12 µm großen Schichtdicke gemessen.

Rein rechnerisch wären bei gleicher Halbleiterschichtdicke Oberflächenvergrößerungen bis zum Faktor 2000 möglich. Vermutlich konnte in den Versuchen obiger Forscher der Farbstoff nicht in alle Poren eindringen und damit nicht an der gesamten TiO₂-Oberfläche immobilisieren. Poren, die aufgrund ihrer geringen Größe für den Farbstoff unzugänglich waren, kommen auch für eine LHCII-Bindung nicht in Frage. Eine Immobilisierung des Proteins in diese Poren ist unwahrscheinlich und damit die rechnerisch mögliche Oberflächenvergrößerung nicht als Grundlage zur Bestimmung der maximal möglichen Belegungsdichte zu verwenden.

TiO₂-beschichtete ITO-Glasplatten zeigten eine über 5-fach stärkere Bindung von LHCII als TiO₂-beschichtete Objektträger. Mindestens 0,15 nmol LHCII konnten hier auf 1 cm² immobilisiert werden, was einem Platzangebot von ~1000 nm² pro LHCII-Molekül entsprach. Die Ursache für diese dichtere Belegung mußte mit der SnO₂-Beschichtung der Glasplatte in Verbindung stehen, da dies die einzige Variation im Versuchsablauf darstellte. Möglicherweise beeinflusste die Glasoberfläche die Ausbildung der porösen TiO₂-Matrix in günstiger Weise.

Mit diesem Versuch konnte auch gezeigt werden, daß LHCII-Moleküle in die poröse Matrix des Halbleiters hinein diffundierten. Bei einer reinen Protein-Immobilisation auf der obersten TiO₂-Schicht hätte es sonst zu einer Bindung von einem Komplex pro nm² kommen müssen, was bei einem Flächenbedarf des LHCII-Monomers von ca. 11,5 nm² (bei Aufsicht auf die Thylakoidmembran, abgeleitet aus Kühlbrandt *et al.*, 1994) als sehr unwahrscheinlich erachtet wurde.

Kay und Grätzel (1993) und weitere Forscher erreichten mit verschiedenen Farbstoffen eine deutlich höhere Belegungsdichte auf TiO₂ (bis zu ca. einem Molekül pro nm²). Durch die Oberflächenvergrößerung des TiO₂ entsprachen dies ca. 100 nmol Farbstoff pro cm². Auch Topoglidis *et al.* (2000) gelang mit löslichem Protein eine deutlich dichtere Belegung der Halbleitermatrix als in den Versuchen dieser Arbeit mit dem LHCII. So konnte eine Immobilisation von 19 nmol Fe-Cytochrom in die poröse Anatasstruktur einer 8 µm dicken TiO₂-Schicht einer Fläche von 1 cm² nachgewiesen werden. Die geringere Belegung im Vergleich mit den Farbstoffen wurde hier zum einen auf die geringere Schichtdicke des Halbleiters (in den Farbstoffversuchen 10 - 12 µm) und zum anderen auf den größeren Platzbedarf der Proteine zurückgeführt. Für Fe-Cytochrom wurde ein Flächenbedarf von 7 nm² angenommen.

Aufgrund obiger Ergebnisse wurde auch für den LHCII die Erreichbarkeit einer größeren Bindung an die TiO₂-Matrix angenommen. So könnte bei einer Oberflächenvergrößerung um den Faktor 1000 sowie einem Flächenbedarf des LHCII-Monomers von ungefähr 11,5 nm² eine Steigerung des Immobilisierungsgrads um den Faktor 100 möglich sein. Die Bindung einer Proteinmenge von ~14 nmol/cm² wäre damit theoretisch erreichbar.

Diese Proteinmenge läge dann in der gleichen Größenordnung wie die zu erwartende Stoffmenge an LHCII-Monomer pro Blattfläche einer Pflanze. Kapitel 9.1 zeigt die theoretischen Überlegungen, die zu der Annahme einer LHCII-Menge von ~6-60 nmol/cm² führten. Im praktischen Experiment an Erbsen wurden zwar nur ~1,5 nmol LHCII/cm² detektiert, doch handelte es sich hierbei auch um erst 10 Tage alte Pflanzen mit noch nicht vollständig ausgewachsenen Blättern.

Insgesamt könnte also in einer Solarzelle nach M.Grätzel eine ähnlich große Oberflächenvergrößerung zur Absorption der Lichtenergie erreicht werden wie im natürlichen System der Pflanze.

Vermutlich wird diese hohe Belegungsdichte des Halbleiters mit LHCII nur über die Modifikation der Detergenumgebung erreicht werden können. Es muß getestet werden, welchen Einfluß ungeladene Detergentien wie Triton, OG, LM o.ä. auf das Bindungsverhalten des Proteins haben. Je nach Größe der Detergensemizelle kann von einem mehr oder weniger großen Platzbedarf des LHCII-Moleküls über 11,5 nm² hinaus ausgegangen werden. Detergentien mit einer kleinen Aggregationszahl könnten hier möglicherweise auch zur Bildung kleinerer LHCII-Detergens-Einheiten führen und damit den Platzbedarf des Komplexes reduzieren. Auch ein Eindringen der Komplexe in Poren kleineren Durchmessers könnte auf diese Weise erreicht werden.

Außerdem könnte die tatsächliche Oberflächenvergrößerung bei den mit TiO₂ beschichteten Glasplatten bestimmt und möglicherweise über die Wahl unterschiedlich großer TiO₂ Partikel optimiert werden (nach der Methode von O'Regan und Grätzel, 1991 und Kay und Grätzel, 1993).

Darüber hinaus könnten auch mehrere LHCII-Komplexe zu übergeordneten Strukturen zusammengelagert werden ähnlich ihrem Vorliegen in der Thylakoidmembran. Eine monomolekulare Bindung der Komplexe an TiO₂ wird nicht notwendig sein, da ein Energietransfer zwischen den einzelnen LHCII-Molekülen mit hoher Effizienz stattfindet und damit die Lichtab-

sorption von Komplexen ohne direkte Interaktion mit TiO_2 potentiell zu einer Elektroneninjektion in das Leitungsband des Halbleiters führen kann (vgl. Kapitel 7.3.4).

7.3.3 Die TiO_2 -Oberfläche trägt in wässriger Umgebung keine positiven Ladungen

Wie in Kapitel 7.3.2 schon angedeutet, konnte eine effiziente Bindung von LHCII an TiO_2 nur in Abwesenheit von SDS erfolgen. Es gab zwei mögliche Erklärungen hierfür. Zum einen konnte das Detergens alle potentiellen Bindungsstellen an der positiv geladenen Halbleitermatrix besetzt haben, so daß nachfolgend keine Bindung des LHCII an die Oberfläche möglich war. Zum andern konnte die Halbleiteroberfläche eine negative Ladung tragen und LHCII-Moleküle, umhüllt von einer SDS-haltigen Detergensmizelle, abstoßen.

Im folgenden werden beide Erklärungsmöglichkeiten beleuchtet.

Die meisten Versuche zur Immobilisation von Farbstoffen auf TiO_2 deuteten auf eine Interaktion des „Sensitizers“ über negative Ladungen mit einer positiv geladenen TiO_2 -Oberfläche hin und sprachen daher für die erste Erklärungsmöglichkeit.

So zeigten Wang *et al.* (2000) an Hemicyaninen, daß eine Immobilisation an TiO_2 nur in Anwesenheit von Sulfonylgruppen möglich war. Hemicyanine ohne diese funktionelle Gruppe zeigten nahezu keine Bindung an den Halbleiter.

Ähnliches wurde von Hagfeldt und Grätzel (2000) beschrieben. Ihnen gelang die Immobilisation von Ru-Komplexen mit Namen N3 (vgl. Tabelle 1, Kapitel 1.4.2) über farbstoffgebundene Carboxylgruppen. Am wahrscheinlichsten erachteten sie eine Bindung des N3 über zwei seiner vier Carboxylgruppen, wobei jede COO^- -Gruppe entweder mit einem Ti^{4+} ionisch interagieren oder aber mit an TiO_2 adsorbierten Hydroxylgruppen eine Wasserstoffbrückenbindung eingehen sollte.

Übereinstimmende Ergebnisse erreichten Kay und Grätzel (1993) mit Chlorophyllderivaten. So gelang ihnen keine nennenswerte Kopplung von Chla und Phäophytin a an TiO_2 , wohl aber eine effiziente Bindung von Phäophorbid a, einem Phäophytin a-Derivat mit einer freien Carboxylgruppe an Stelle des Phytolrests. Auch sie postulierten, daß eine Pigmentbindung nur in Anwesenheit negativer Ladungen erfolgen kann. Die Ladungen sollen mit der positiv geladenen Halbleiteroberfläche interagieren.

Im Gegensatz zu diesen Experimenten konnte in der vorliegenden Arbeit eine sehr gute Immobilisierung von Chla an TiO_2 gezeigt werden. Allerdings fanden diese Versuche in einer wässrigen Umgebung mit einem ungeladenen Detergens statt, wogegen die oben zitierten Versuche in einer organischen Lösungsmittelatmosphäre durchgeführt worden waren. Offenbar spielte die An- oder Abwesenheit von Wasser bei der Molekül immobilisation am Halbleiter eine entscheidende Rolle.

Diesen Verdacht erhärteten Versuche von Lion (2001). So gelang ihm auf identischen Halbleiteroberflächen keine Immobilisation des vierfach negativ geladenen Cyaninfarbstoffs Cy5.5 bei Aufbringung in wässriger Umgebung, wohl aber in ethanolischer Umgebung. Dies führte zu dem Schluß, daß eine Veränderung der exponierten Ladungen am TiO_2 umgebungsabhängig stattfinden muß.

Damit wurde ausgeschlossen, daß der Verlust der LHCII-Bindung an dem Halbleiter durch eine SDS-Belegung der TiO_2 -Matrix erklärt werden kann. Wenn SDS aufgrund seiner negativen Ladungen mit der positiven Halbleiteroberfläche interagieren würde, wäre auch in den Versuchen von Lion eine effiziente Bindung von Cy5.5 in wässriger Umgebung möglich gewesen. Diese Erklärungsmöglichkeit der unzureichenden LHCII-Bindung an TiO_2 in Anwe-

senheit von SDS wurde daher fallen gelassen. Sie hätte zudem nicht erklärt, warum auch LHCII-Cy5.5 schlechter an TiO_2 immobilisierte als LHCII. Bei einer Besetzung der Bindungsplätze am Halbleiter durch den Farbstoff wäre es zwangsläufig auch zur LHCII-Immobilisierung gekommen.

Ob es verursacht durch die wäßrige Umgebung zu einer Maskierung der positiven Ladung der TiO_2 -Oberfläche kam oder ob sogar eine Ladungsumkehr erfolgte, konnte nicht abschließend determiniert werden. Die Befunde von Weidmann *et al.* (1999) können in beide Richtungen gedeutet werden. So führten die Forscher einige Untersuchungen zur Wasserbindung an der Halbleitermatrix durch. Sie wiesen darauf hin, daß es sich um ein sehr hydrophiles Material handelt, welches an Luft Wasser physikalisch anlagern, es aber auch chemisch in Form von Hydroxylionen binden kann. Sie zeigten, daß man das physikalisch gebundene Wasser durch ein kurzes Erhitzen der Halbleiterschicht auf 100°C entfernen kann, dann aber die Hydroxylionen noch immer an der TiO_2 -Oberfläche verbleiben. Sie zeigten weiterhin, daß diese verbleibenden Hydroxylionen die Energiekonversionsrate nicht beeinträchtigen, sie maßen sogar eine leichte Steigerungen der elektrischen Leistung photovoltaischer Zelle mit Halbleitern dieser Art.

Aus den genannten Untersuchungen wurde gefolgert, daß bei Anwesenheit von Wasser die TiO_2 -Oberfläche hydratisiert vorliegt und Ti^{4+} -Ionen zusätzlich durch Hydroxylionen abgeschirmt werden. Ein Verlust der exponierten positiven Ladung ergibt sich hieraus folgerichtig. Eine Exposition negativer Ladungen kann zwar hieraus nicht zwingend geschlossen werden, wird aber aufgrund der Experimente mit Cy5.5 (Lion, 2001) sowie den eigenen Versuchen mit LHCII in An- und Abwesenheit von SDS als wahrscheinlich erachtet. Ein reiner Ladungsverlust an Stelle einer Ladungsumkehr hätte nicht zwangsläufig zum Verlust der SDS- bzw. Farbstoffbindung an TiO_2 führen müssen.

Endgültig konnte dieses Phänomen in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht erklärt werden. Bei Vorlage einer negativ geladenen TiO_2 -Oberfläche hätte auch eine stärkere Bindung von LHCII des Klons Lys6 gegenüber dem Wildtypprotein gefordert werden können, was sich aber experimentell nicht bestätigte.

Zwei mögliche Erklärungen gäbe es hierfür. So hätte die Lys6-Domäne wenig nach außen exponiert und damit für eine Interaktion mit der Halbleitermatrix eine schlechte Zugänglichkeit zeigen können. Untersuchungen von Huschenbett (2001) zeigten übereinstimmend mit dieser Argumentation eine schlechte Farbstoff-Markierbarkeit des Protein-N-terminus im gefalteten Protein. Dem entgegen standen jedoch die eigenen Versuche zur SDS-Abreicherung auf der HAP-Säule. Hier hatten die sechs zusätzlichen positiven Ladungen der Lys6-Mutante einen bedeutenden Einfluß auf die Matrixbindung, weshalb diese Erklärung für die nicht erhöhte Bindung von Lys6-LHCII an TiO_2 als unwahrscheinlich erachtet wurde.

Andererseits ist über die Art der Proteinbindung an TiO_2 so gut wie nichts bekannt. Es ist durchaus möglich, daß nur bestimmte Proteindomänen für die Interaktion mit dem Halbleiter verantwortlich sind und sich die Abfolge der sechs Lysine an einer für die Bindung unrelevanten Stelle befindet.

Zusammenfassend konnte der Verlust der positiven Ladung der TiO_2 -Oberfläche in Wasser gezeigt werden, eine Ladungsumkehr bleibt jedoch nur ein wahrscheinliches Szenario.

7.3.4 LHCII ist kein Elektroneninjektor, aber als Teil eines biomimetischen Modells ein potentieller Sensitizer

Wenngleich es einer weiteren Optimierung bedarf, konnte in dieser Arbeit eine Immobilisation von LHCII in nicht unerheblichem Maß erreicht werden. Eine direkte photovoltaische Nutzung der von den Lichtsammelkomplexen absorbierten Lichtenergie scheiterte dagegen. Der Nachweis einer Elektroneninjektion von den Protein gebundenen Chlorophyllen in das Leitungsband des Halbleiters konnte nicht erbracht werden. Offenbar kann Chla des LHCII im Gegensatz zu seiner Funktion im „special pair“ des Reaktionszentrums keine Elektronen abgeben.

In weitergehenden Versuchen wird sich zeigen, ob die Lichtsammeleffizienz von LHCII über die Kopplung eines Energieakzeptors und Elektroneninjektors trotzdem photovoltaisch nutzbar gemacht werden kann. Wie in Kapitel 4.2.4.3 beschrieben, gelang es in Versuchen dieser Arbeit, die vom LHCII absorbierte Lichtenergie zu einem hohen Prozentsatz auf Maleimido-BTI zu übertragen. Besäße dieser Farbstoff im angeregten Zustand ein so stark negatives Redoxpotential, daß er die vom LHCII erhaltene Lichtenergie zur Elektroneninjektion in das Leitungsband von TiO_2 verwenden könnte, wäre die von LHCII absorbierte Lichtenergie photovoltaisch nutzbar.

Erste Hinweise auf eine Elektroneninjektion hat man für die, ebenso wie das Maleimido-BTI, zur Gruppe der Rylene gehörenden Perylenfarbstoffe gefunden. Ferrere *et al.* (1997) wiesen zwar für ein Perylenderivat nur eine geringe Elektroneninjektion in TiO_2 nach (Stromflüsse in der Größenordnung von nur $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ konnten gemessen werden), erreichten aber eine Verbesserung des Stromflusses um den Faktor 100 bei Verwendung von SnO_2 als Halbleitermaterial.

SnO_2 besitzt im Leitungsband ein um 0,5 V geringer negatives Redoxpotential als TiO_2 . Das bedeutet, daß auch der Elektroneninjektor im angeregten Zustand ein weniger negatives Redoxpotential benötigt, um seine Elektronen an den Halbleiter abzugeben. Für das verwendete Perylen erhöhte sich in den Versuchen mit der Modifikation der Halbleitermatrix entscheidend das Redoxpotentialgefälle und erleichterte das Zustandekommen des Stromflusses. Da aber aufgrund des geringen negativen Redoxpotentials des Leitungsbands in SnO_2 der „Quasi-Fermi-Level“ auch geringer negativ war (vgl. Kapitel 1.4.2), konnten per se im Vergleich mit TiO_2 nur geringere Photospannungen abgegriffen werden.

Ein möglicher Ausweg um hohe Stromflüsse und abgreifbare Spannungen zu erreichen, könnte die Wahl von TiO_2 der Rutilstruktur darstellen. TiO_2 dieser Konformation entsteht durch einen Sinterprozeß von über 500°C (G. Kirsten, Diplomarbeit in der AG Breuer, physikalische Chemie der Universität des Saarlands, <http://www-hb.pc.uni-sb.de/~guki0000/chemie/diplom/index.html>; für die Anatasstruktur sind nur 450°C notwendig). Das Redoxpotential im Rutil liegt nur um 0,2 V niedriger als das im Anatas, die Verminderung der maximal abgreifbaren Spannung wäre daher geringer als bei der Verwendung einer SnO_2 -Matrix.

Daß in die Poren der Rutilstruktur pro Flächeneinheit 35% weniger Farbstoff einlagerbar ist als in die des Anatas (Park *et al.*, 2000), könnte für Versuche mit dem LHCII einen nur geringen Verlust darstellen, da das Proteingerüst 14 Chlorophyll hoch koordinativ bindet und damit selbst eine weitere Oberflächenvergrößerung darstellt. Diese koordinative Anordnung der Chromophore stellt einen wesentlichen Vorteil gegenüber den sonst verwendeten Pigmentsystemen dar, die in viel größerem Maße auf Matrix bedingte Oberflächenvergrößerungen angewiesen sind. Neben den in Kapitel 1.4.2 vorgestellten Kostenvorteilen einer photovol-

taischen Zelle unter Lichtabsorption von LHCI_{II} könnte gerade die zusätzliche Oberflächenvergrößerung durch die Aufbringung dreidimensionaler Pigment-Protein-Strukturen einen entscheidenden Vorteil darstellen und möglicherweise auch die Wahl anderer Halbleiterstrukturen geringerer Porosität ermöglichen.

Neben Farbstoffen der Rylengruppe eignen sich potentiell auch Cyaninfarbstoffe für Versuche zur Elektroneninjektion. Der nicht zu unterschätzende Vorteil der erst genannten liegt jedoch in ihrer extremen Lichtstabilität (*cf.* Quante *et al.*, 1995), welche sie auch für längere photovoltaische Nutzungen auszeichnen würde. Von einem guten „Sensitizer“ wird ein Überdauern von 10^8 Redoxzyklen erwartet, was in der Solartechnik einer Lebensdauer von 20 Jahren entspricht.

Bislang ist jedoch die Wahl eines geeigneten Farbstoffsensitizers noch zufallsbehaftet. Die genauen Anforderungen an den Farbstoff konnten noch nicht ermittelt werden, weshalb es im Versuch immer zu testen sein wird, ob eine erfolgreiche Energiekonversion erreichbar ist. So ist es z.B. unerklärlich, warum Anthocyane so geringe Energiekonversionen zeigen, obwohl die Elektroneninjektion in das Halbleiterleitungsband als sehr effizient bestimmt wurde (Cherepy *et al.*, 1997). Vermindern hier Rekombinationsprozesse oder Farbstoffaggregationen die photovoltaische Ausbeute (vgl. Kapitel 7.3.5)?

7.3.5 Längerfristige Erhöhung der Energiekonversion in einer Grätzelzelle mit einem biomimetischen Modell aus LHCI_{II} und Farbstoff-Elektroneninjektor als Sensitizer

Neben der schon in Kapitel 7.3.4 dargestellten Optimierung der Energiekonversion durch Variation der Halbleitermatrix (Anatas- versus Rutilstruktur, SnO₂), sind in der Vergangenheit von einigen Forschern andere Möglichkeiten zur Steigerung der photovoltaischen Effizienz gefunden worden. Sie sollen hier als Ausblick auf zukünftige Versuche mit der Grätzelzelle dargestellt werden.

Ein Augenmerk wird auf einer effizienten Vermeidung des Dunkelstroms liegen. Unter dem Dunkelstrom versteht man die Rekombination der in das Leitungsband injizierten Elektronen mit dem Elektrolyten. Während sich Ladungsrekombinationen von Elektronen des Leitungsbandes mit den verbleibenden Farbstoffkationen in zeitaufgelösten Messungen als vernachlässigbar herausgestellt haben (vgl. Kapitel 1.4.2), mindert die hier genannte Rekombination die photovoltaische Leistung der Zelle deutlich. Nazeeruddin *et al.* (1993) und Huang *et al.* (1997) setzten daher 4-*tert*-Butylpyridin in ihren Versuchen ein. 4-*tert*-Butylpyridin und Poly(2-vinylpyridin) reduzierten die Elektronenrekombination um 1 - 2 Größenordnungen. Die Energiekonversion wurde dadurch um 29% erhöht. Deng *et al.* (1997) verminderten das selbe Phänomen durch Adsorption einer 300 nm dünnen, dicht gepackten TiO₂-Schicht auf der Glasoberfläche vor Aufbringung der porösen, farbstoffbeladenen TiO₂-Schicht.

Andere Modifikationen der Halbleitermatrix wurden beispielsweise von Wang *et al.* (2001) beschrieben und dienten der Erhöhung der Elektronendichte im TiO₂-Leitungsband. So maßen sie eine Zunahme der Energiekonversion um 27,3% nach ZnO-Beschichtung der TiO₂-Partikel.

Eine sehr interessante Substanz, die in jedem Fall Beachtung erfahren sollte, ist darüber hinaus Desoxycholsäure (DOC). So maßen bislang einige Autoren erhöhte Energiekonversionsraten bei Zusatz dieses Agens. Kay und Grätzel (1993) gaben dafür drei mögliche Ursachen

an. So könnte DOC selbst an den Halbleiter binden und eine gleichmäßigere Farbstoffverteilung auf der porösen Oberfläche bewirken. Ohne DOC könnten bei ungenügender Farbstoffzufuhr glasnahe Halbleiterbereiche nicht besetzt werden und damit isolierend wirken. Zudem wurde von den Forschern eine Verminderung des negativen Redoxpotentials des Leitungsbandes von TiO_2 durch DOC angenommen. Auch eine Anhebung des negativen Redoxpotentials des angeregten Sensitizers wurde als möglich erachtet. Beides würde zu einer besseren Elektroneninjektion führen, da sich die Redoxpotentialdifferenz zwischen Farbstoff und Halbleiter vergrößern würde.

Neben der Halbleitermatrix wird es zukünftig auch notwendig sein, den richtigen Elektrolyten zu finden. In der Wissenschaft gibt es zur Zeit einen Trend zu festen „Elektrolyten“, die ein aufwendiges Verschließen der photovoltaischen Einheiten überflüssig machen könnten. Es handelt sich dabei um sog. Lochleiter. Der durch Elektroneninjektion zum Kation gewordene Farbstoff wird über eine Lochinjektion in den Lochleiter regeneriert. Ein Beispiel einer solchen Substanz wurde von Bach *et al.* (1998) aufgezeigt. Sie beschreiben eine Grätzelzelle mit Rutheniumkomplexen als Sensitizer und einer Tetrakispirobifluorene-Verbindung als Lochleiter. Es wurden zwar um ca. 50% geringere Energiekonversionsraten als mit flüssigen Elektrolyten gemessen, doch könnten Zellen diesen Typs eine längere Lebensdauer besitzen. Ein Auslaufen oder Verdampfen des Elektrolyten wäre praktisch ausgeschlossen.

Aber auch die Wahl des Sensitizers wird entscheidend sein. Soll der LHCII in der Grätzelzelle als Lichtsammler dienen, werden an ihn viele Forderungen gestellt werden. So muß er, wie auch der Farbstoff-Elektroneninjektor, eine ausreichend lange Lebensdauer besitzen. Erste Versuche von Bouzek und Kavan (1999) zeigen, daß nicht nur das Licht selbst zu Schädigungen des Komplex über photooxidative Prozesse führen kann. Auch die lichtinduzierte Erwärmung der Grätzelzelle verdient Beachtung. So haben obige Autoren in einem mathematischen Modell die potentielle Hitzeentwicklung durch Lichteinstrahlung in Solarzellen des Grätzeltyps errechnet. Licht einer Intensität von 94 mW/cm^2 wurde bei einer Lufttemperatur von 25°C eingestrahlt und die elektrische Leistung der Energiekonversion gemessen. Die Hitzeentwicklung wurde dann nach folgender Formel ermittelt.

$$\text{Hitzeentwicklung}[\text{mW/cm}^2] = \text{Lichtabsorption}[\text{mW/cm}^2] - \text{elektrische Leistung}[\text{mW/cm}^2]$$

Ohne Luftbewegungen wurde eine Temperatur von maximal $46,9^\circ\text{C}$ ermittelt, bei Luftbewegungen von 10 m/s dagegen fiel die Temperatur auf $30,1^\circ\text{C}$.

Reinsberg (2000) konnte jedoch bei Temperaturen von 37°C schon deutliche Schädigungen der LHCII-Komplexe erreichen, was klar werden läßt, daß es auch im Hinblick auf den Lichtsammlerkomplex Notwendigkeit zur Optimierung gibt. Erste Versuche von Fender (2001) sind hier vielversprechend. So konnte durch Wahl geeigneter Detergentien sowie anderer Chemikalien die Temperaturstabilität des LHCII erhöht werden. Weitere, genetische Proteinoptimierungen sind für zukünftige Versuche geplant.

Insgesamt wird die technische Nutzbarkeit von LHCII zur Stromgewinnung davon abhängen, ob es gelingt, einen passenden Farbstoff zu finden. Er muß sowohl die Anregungsenergie von LHCII übernehmen können als auch diese zur Elektroneninjektion in das Leitungsband von TiO_2 nutzen können.

Darüber hinaus wird es wichtig sein, den LHCII selbst längerfristig zu stabilisieren. Ob eine photovoltaische Zelle mit LHCII als Teil des „Sensitizers“ darüber hinaus noch Grätzelzellen mit künstlichen „Sensitizern“ überlegen sein wird, bleibt abzuwarten. Mögliche, schon in Kapitel 1.4.2 genannte Angriffspunkte wären eine kostengünstigere Herstellung oder aber eine höhere Energiekonversion. Gerade letzteres könnte durch die in diesem Kapitel genannten

Modifikationen möglicherweise erreicht werden. Ob aber eine höhere Energiekonversion als mit „Black dye“ (Tabelle 1, Kapitel 1.4.2) erreichbar wird, kann nicht vorausgesagt werden. Dafür ist über den genauen Mechanismus der Elektroneninjektion und des Elektronentransports zu wenig bekannt.

7.3.6 Ausblick: weitere Möglichkeiten der technischen Nutzung biomimetischer Modelle aus LHCII und angekoppeltem Energieakzeptor

In dieser Arbeit wurde eine Möglichkeit der technischen Nutzung biomimetischer Modelle aus LHCII und angekoppeltem Energieakzeptor fokussiert. Die Umwandlung der Lichtenergie in elektrischen Strom ist jedoch nur eine unter mehreren Optionen der technischen Nutzung der Lichtsammeleffizienz des LHCII. Von anderen Forschern gewählte Ansätze sollen als Ausblick auf künftige Verwendungsoptionen des LHCII vorgestellt werden.

7.3.6.1 Energieleitungssysteme

Neben der Absorption großer Wellenlängenbereiche des sichtbaren Lichts besteht die Hauptfunktion des LHCII in der nahezu verlustfreien Energieweiterleitung zum Reaktionszentrum des PSII (vgl. Kapitel 1.2). Ein technisches Ziel kann es daher sein, den LHCII für eine Energieleitung in photonischen Kabeln zu verwenden und ihn möglicherweise auch in molekularen optischen Schaltungen einzusetzen.

Photonische Kabel ermöglichen einen ultraschnellen, nahezu verlustfreien Transport von Anregungsenergie ausgehend von einem absorbierenden Chromophor über eine Transmissions-einheit (meist eine Kette von Farbstoffen mit sehr guten Energietransfereigenschaften) hin zu einem Fluoreszenzmitter. Einige Ansätze zur Verwirklichung solcher Energieleitungssysteme existieren und sollen hier vorgestellt werden.

Grundprinzip der synthetischen Energieleiter ist eine orientierte Anordnung mehrerer Chromophore zur effizienten Energieübertragung im System. Dies wird in der Regel entweder über eine kovalente Verknüpfung der Chromophore untereinander erreicht oder aber durch eine spezifische Matrixbindung.

Kovalente Kopplungen wurden zuerst von Therien (z.B. Lin *et al.*, 1994) und Lindsey (z.B. Wagner und Lindsey, 1994) realisiert und sind mittlerweile stark optimiert. So wurde kürzlich von Miller *et al.* (2000) ein photonisches Kabel bestehend aus einem Perylenderivat als absorbierendem Chromophor, einem Porphyrindimer (meso-meso verknüpft) als Transmissionseinheit und einem Phthalocyanin als Fluorophor synthetisiert. Vom Perylen absorbierte Lichtenergie wurde nahezu quantitativ innerhalb von 2ps zum Phthalocyanin übertragen und dort als Fluoreszenzlicht emittiert.

Einige dieser Energieleitungssysteme haben eine dendrimere Struktur, d.h. um ein zentrales Chromophor sind dreidimensional mehrere Chromophore kovalent gebunden und bilden eine einfache Lichtsammelantenne. Ein Beispiel für eine solche Struktur stellt das von Shinmori *et al.* (2001) entwickelte Porphyrinhexamer dar.

Neben einer kovalenten Verknüpfung der Chromophore zur effizienten Energieleitung existieren einige Möglichkeiten zur Matrixkopplung der beteiligten Pigmente. Bekannte Matrices sind Cyclodextrin (Jullien *et al.*, 1996), Polystyrol (z.B. Sykora *et al.*, 2000) oder aber in neuerer Zeit Proteinstrukturen. So gelang Kashiwada *et al.* (1999 und 2000) erstmals eine orientierte Kopplung von Bakteriochlorophyllen an synthetische Polypeptide. Diese Polypep-

tide hatten eine bakteriellen Lichtsammelproteinen ähnelnde Aminosäuresequenz und konnten durch Zugabe der Pigmente zu LH1 (bakterieller Lichtsammelkomplex) ähnlichen Strukturen gefaltet werden. Spektroskopische Untersuchungen demonstrierten die gelungene Biomimese.

Eine dritte Möglichkeit der orientierten Anordnung von Chromophoren wird nur von sehr wenigen Arbeitsgruppen durchgeführt.

Es handelt sich hierbei um die spontane Selbstorganisation künstlicher Lichtsammelantennen ohne Struktur gebende Matrix. So gelangen Tamiaki *et al.* (1996) eine Biomimese bakterieller Chlorosomen durch die Aggregation von Bakteriochlorinen. In bakteriellen Chlorosomen sind Bakteriochlorophylle c, d und e so orientiert, daß eine effiziente Energieübergabe auf Bakteriochlorophyll a stattfindet. Diese Pigmentorientierung erfolgt ohne die Anwesenheit Struktur gebender Proteine. Tamiaki *et al.* (1996) erreichten ähnliche Anordnungen von Zink-Chlorinen in unpolaren Lösungsmitteln (z.B. Hexan), aber auch in wäßrigen Lösungen von nichtionischen Detergentien (z.B. Triton) oder Lipiden (z.B. α -Lecithin). Lichtsammlersysteme bestehend aus 50-100 Zink-Chlorinen konnten die absorbierte Anregungsenergie auf ein angekoppeltes Bakteriochlorin übertragen, Energietransfereffizienzen von über 60% wurden gemessen (Miyatake *et al.*, 1999).

Haycock *et al.* (2000) erreichten eine ähnliche Selbstorganisation künstlicher Lichtsammelantennen mit synthetischen Porphyrinsystemen und konnten auch einen Energietransfer zwischen den beteiligten Chromophoren hin zu einem singulären Porphyrinderivat messen.

Der Einsatz des LHCII in photonischen Kabeln hätte viele Vorzüge gegenüber den genannten Ansätzen. So wäre im einzelnen LHCII per se schon eine effiziente Energieleitung gegeben, aufwendige chemische Modifikationen der Pigmente oder Matrices wären überflüssig. Des weiteren könnte der LHCII in seiner rekombinanten Form über das Einführen bestimmter Aminosäuren orientiert an Oberflächen immobilisiert werden (vgl. z.B. Immobilisationsexperimente dieser Arbeit) und so in einer Serienschaltung einen Energietransfer über größere Distanzen ermöglichen (das biomimetische Modell eines Chlorosoms (s.o.) weist hier seine Grenzen auf). Eine Farbstoffbindung am Ende einer solchen LHCII-Kette könnte dann die Richtung des Energietransfers determinieren. Der Farbstoff könnte, wie in den bisher hergestellten biomimetischen Modellen, als Energiefalle dienen und den Energietransfer auch über mehrere Proteinmoleküle hinweg fokussieren.

Eine technische Nutzung der photonischen Kabel würde der Einbau in molekulare optische Schaltungen ermöglichen. Optische Schaltungen der genannten Art können durch einen Umgebungsimpuls (Licht, magnetisches Feld, chemisches Agens) eine Veränderung des Absorptions- oder Emissionsverhalten des betreffenden Systems induzieren. Eine solche Schaltung wird im folgenden exemplarisch skizziert.

Ambroise *et al.* (2001) konstruierten ein photonisches Kabel bestehend aus einem Boron-dipyrrin-Farbstoff als absorbierender Chromophor, einem Zink-Porphyrin als Transmissions-einheit und einem basischen Porphyrin als Emitter. Durch Kopplung eines Mg-Porphyrins an das System wurde eine redoxabhängige Inhibition der Emission des basischen Porphyrins möglich. Wurde Mg-Porphyrin umgebungsinduziert zum Kationradikal oxidiert, kam es zur Fluoreszenzlöschung des Emitters, die Anregungsenergie relaxierte strahlungslos über das Mg-Porphyrin-Kationradikal.

Eine Anlagerung eines solchen Mg-Porphyrins an einen LHCII-Energieleiter könnte diesen in gleicher Weise zur optischen Schaltung modifizieren und die Fluoreszenzemission regulierbar machen.

7.3.6.2 Nutzung des Sonnenlichts zur Energiespeicherung in chemischer Form

Herausragend auf diesem Forschungsgebiet sind die Arbeiten von Moore und Gust (Gust *et al.*, 2001). Ihnen gelang die Synthese von Triadensystemen, in denen es, induziert durch Lichtabsorption, zur stabilen Ladungstrennung (Lebenszeit im ns-Bereich) kommt. Eine der konstruierten Triaden, bestehend aus einem Porphyrin und einem Carotinoid als Elektronendonoren sowie einem Chinon als Elektronenakzeptor, wurde orientiert in die Membran eines ATP-Synthase-haltigen Liposoms eingebaut (Steinberg-Yfrach, 1998). Das chinonhaltige Ende der Triade wurde zu Liposomenaußenseite hin positioniert. Nach Excitation des Porphyrins kam es zur Ladungstrennung über die Triade hinweg und damit zur Bildung von Carotinoid⁺-Porphyrin-Chinon⁻ (zunächst wurde vom Porphyrin ein Elektron an das Chinon abgegeben, danach reduzierte das Carotinoid das Porphyrin).

Das Chinon⁻ gab das Elektron an ein freies Chinon der liposomalen Membran ab, welches dann unter Anlagerung von H⁺ des wäßrigen Außenmediums zum Semichinon reduziert wurde. Das Semichinon diffundierte durch die Membran und reduzierte unter H⁺-Abgabe an das liposomale Lumen das oxidierte Carotinoid der Triade. Es kam damit zum Aufbau eines Protonengradienten durch die photochemische Ladungstrennung. Dieser Protonengradient trieb nachfolgend die ATP-Synthase an und bewirkte eine chemische Fixierung der vom Porphyrin aufgenommenen Lichtenergie.

Kuciauskas *et al.* (1999) erweiterten die Triadenkonstrukte durch das Einfügen eines dendrimeren Porphyrinsystems, bestehend aus vier Zink-Porphyrin-Derivaten und konstruierten damit ein erstes Konstrukt mit Lichtsammel- und Ladungstrennungsfunktion (Dieses Konstrukt wurde mittlerweile von Kodis *et al.*, 2001, weiterentwickelt und optimiert). LHCII könnte hier den Platz des synthetischen Porphyrin-Dendrimers einnehmen und zu einer stärkeren Fixierung der Lichtenergie in Form chemischer Energie führen. Zum einen würde LHCII Licht größerer Wellenlängenbereiche absorbieren als die künstliche Lichtsammelantenne, zum anderen würde der Komplex Energie größerer Lichtintensitäten aufnehmen durch die dreidimensionale Anordnung der 12-14 energetisch gekoppelten Chlorophylle pro monomerer Untereinheit. Eine höhere Produktion von ATP wäre möglich. Realisierbar wäre dieses Szenario am ehesten durch ein LHCII-Farbstoff-Komplex als Ersatz für das Porphyrin der oben beschriebenen Chinon-Porphyrin-Carotinoid-Triade. Von LHCII auf den Farbstoff transferierte Lichtenergie würde zu einem Elektronentransfer vom Farbstoff auf das Chinon führen. Eine Reduktion des Farbstoffs gelänge im Anschluß über eine Oxidation des Carotinoids.

Es existiert damit insgesamt nicht ein Königsweg der technischen Nutzung der Lichtabsorption und des effizienten Energietransfers von Lichtsammelkomplexen. Die hier vorgestellten Optionen stellen nur eine Selektion der potentiellen Nutzungsmöglichkeiten dar. Hilfreich für die meisten Anwendungen wird die Verwendung der LHCII-Farbstoff-Konstrukte, also u.a. die hier konstruierten biomimetischen Modelle, sein. Sie ermöglichen eine stärkere Fokussierung der Anregungsenergie und verändern diese durch Emission anderer Lichtqualitäten oder durch Elektronenabgabe.

8. Zusammenfassung

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion eines biomimetischen Modells für ein pflanzliches Photosystem bestehend aus dem LHCII als Absorptions- und Energietransfereinheit und einem N-terminal an das Protein gebundenen Farbstoff als Energieakzeptor. Mehrere LHCII-Farbstoff-Konstrukte wurden getestet, die beste Energietransfereffizienz von komplexgebundenem Chla zum Energieakzeptor konnte an LHCII-BTI-Konstrukten gemessen werden. Bei Raumtemperatur wurden 70% der Chla-Fluoreszenz in Anwesenheit des Farbstoffs gelöscht, bei 77K waren es bis zu 85%. Dieses Phänomen wurde einem Resonanzenergietransfer von Chla auf Maleimido-BTI zugeordnet.

Die hohe Effizienz des Energietransfers bewies nicht nur die erfolgreiche Konstruktion des biomimetischen Modells, sondern ermöglichte auch erste strukturelle Informationen über die Konformation des Protein-N-terminus. So konnte gezeigt werden, daß eine Energietransfereffizienz von 70% nicht erreicht wird, wenn Energiedonor und Energieakzeptor mehr als 70 Å voneinander entfernt vorliegen. Die Existenz eines in gestreckter Form vom pigmentierten Bereich des LHCII weg zeigenden N-terminus ist daher unwahrscheinlich.

Ähnliches wurde aufgrund der Versuche mit unterschiedlich N-terminal verkürzten LHCII-Cy5.5-Konstrukten postuliert. Cy5.5 war N-terminal an das Protein gebunden, so daß je nach Länge dieser Domäne mit unterschiedlichen Energietransfereffizienzen von Chla auf den Farbstoff gerechnet wurde. Wildtyp-LHCII-Cy5.5 zeigte einen größeren Energietransfer als alle N-terminal verkürzten Konstrukte. Es wurde daher für den N-terminalen Bereich die Vorlage einer Tertiärstruktur vermutet, die den Fluoreszenzfarbstoff im Wildtypkonstrukt im zeitlichen Mittel in eine größere Nähe zum pigmentierten Teil des LHCII bringt. Zur Verifizierung dieser Annahme müßte das LHCII-Cy5.5-Modell im Hinblick auf einen ausschließlichen Energietransfer von Chla auf Cy5.5 optimiert werden. Energierücktransfer müßte unterbunden sein. Darüber hinaus müßte die Dipol-Dipol-Orientierung zwischen Energiedonor (Chla) und Energieakzeptor (Cy5.5) entschlüsselt werden, um aus den Energietransfereffizienzen auf molekulare Abstände schließen zu können.

Die Übergangsdipolmomente der Chlorophylle im LHCII können aus der kristallographisch aufgelösten Struktur (Kühlbrandt *et al.*, 1994) nicht abgelesen werden. Daher bestand in dieser Arbeit neben der näheren Charakterisierung des komplexinternen Energietransfers und der energetischen Übergänge von Chla auf die angekoppelten Farbstoffe die Aufgabe, Grundlagen für eine spätere einzelmolekülspektroskopische Charakterisierung der Dipolmomente zu legen. Ziel war es, LHCII in einer definierten Orientierung zu immobilisieren. Dazu wurde eine Glasoberfläche mit einer Meerrettich-Peroxidase beschichtet, die kovalent mit Ni-NTA verknüpft war. Rekombinante LHCII-Trimere der Mutante S3Ch konnten daran über ihren „His6-tag“ am C-Terminus immobilisiert werden. Die einzelmolekül-spektroskopischen Untersuchungen fanden nachfolgend in einer detergenshaltigen Flüssigkeitszelle statt. Über eine vollständige Depolarisation der Chlorophyllfluoreszenz wurde hier die Immobilisation der Trimere senkrecht zu ihrer Symmetrieachse nachgewiesen.

An LHCII-Monomeren wurde dagegen die Emission linear polarisierten Lichts detektiert, was auf die dominierende Emission eines singulären Chla im Komplex zurückgeführt wurde. Fluoreszenzmessungen über einen Zeitraum von mehreren Hundert Sekunden zeigten Polarisations sprünge in der Chlorophyllemission, die darauf hinwiesen, daß nicht immer dasselbe Chla der dominierend Emitter ist. Der Energietransferweg innerhalb des Komplexes scheint nicht komplett determiniert zu sein.

Darüber hinaus wurde die Anwesenheit von „trap states“ (ein Chlorophyllderivat mit einem im angeregten Zustand geringeren Energieniveau als alle anderen Chlorophylle des LHCII mit der Fähigkeit zur strahlungslosen Relaxation) postuliert. So wurde in LHCII-Monomeren und Trimeren ein Chlorophyllbleichen in einem Schritt detektiert, welches am plausibelsten mit einem „trap state“ beschrieben werden kann. Aus der zum Teil gezeigten Reversibilität des Chlorophyllbleichens wurde die Vorlage reversibler „trap states“ vermutet.

Schließlich galt es, in dieser Arbeit zu erforschen, wie die Lichtsammleffizienz von LHCII nutzbar gemacht werden könnte. Aus mehreren Möglichkeiten einer technischen Anwendung wurde eine Umwandlung der absorbierten Lichtenergie in einen Stromfluß angestrebt.

Erstes Ziel auf diesem Weg war die Immobilisation von LHCII auf TiO_2 , einem Halbleiter, wie er auch in Solarzellen nach Grätzel (O'Regan und Grätzel, 1991) verwendet wird. LHCII sollte hier der Lichtabsorption und der Energieleitung dienen und darüber hinaus entweder selbst oder über einen angekoppelten Farbstoff die Lichtenergie zur Elektroneninjektion in das Leitungsband von TiO_2 nutzen. Ein Stromfluß könnte sich etablieren.

Nach Abreicherung des LHCII von SDS konnte eine effiziente Bindung der Komplexe an die Halbleiteroberfläche detektiert werden. Die Lichtsammelkomplexe waren intakt, der komplexinterne Energietransfer zeigte keinerlei Änderungen aufgrund der Immobilisation. Eine direkte Elektroneninjektion von LHCII in das Leitungsband des TiO_2 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Daher wird es für zukünftige Versuche wichtig sein, mit biomimetischen Modellen aus LHCII und angekoppeltem Farbstoff zu arbeiten. Die vom LHCII absorbierte Lichtenergie könnte auf den Farbstoff übertragen und von ihm aus zur Elektroneninjektion in das Halbleiter-Leitungsband genutzt werden. Farbstoffe mit Energieakzeptoreigenschaften gegenüber Chl_a und Elektroneninjektionseigenschaften gegenüber TiO_2 stellen sowohl Cyanine als auch Rylene dar, weshalb zukünftig möglicherweise auf die in dieser Arbeit hergestellten biomimetischen Modelle zurückgegriffen werden kann.

9. Anhang

9.1 Rechnerische und experimentelle Bestimmung der LHCII-Stoffmenge pro Blattfläche

1.) Rechnerische Bestimmung der Stoffmenge

Die LHCII-Trimer-Stoffmenge pro cm^2 Thylakoidmembran liegt bei 1,5 pmol (pers. Mitteilung von H.Kirchhoff, Universität Münster). Dies entspricht 4,5 pmol LHCII-Monomer/ cm^2 . In einem cm^2 Blattmaterial liegen die Thylakoidmembranen in mehreren Schichten übereinander vor. Eine Oberflächenvergrößerung ist gegeben durch:

- a.) die Granastapelung im Chloroplasten
 - b.) die Überlagerung mindestens zweier Chloroplastenschichten pro Zelle (bei einem zellwandständigen Protoplasten, angefüllt mit Chloroplasten)
 - c.) die Ausbildung mehrerer übereinanderliegender Zellschichten im Blatt
- zu a.) Im Chloroplasten liegen in der Regel 10-100 Granathylakoide geldrollenartig übereinander gestapelt vor (Nultsch, 1991). Dies bedeutet eine Stapelung von 20-200 LHCII-haltigen Membranen.

zu b. + c.) Die Überlagerung mehrerer Zellschichten in einem Blatt bewirkt, daß die Gesamtoberfläche der Mesophyllzellen bis zu 100 mal größer ist als die exponierte Blattfläche (Straßburger, 1991). Die Mesophylloberfläche ist dabei zu ca. 70% mit Chloroplasten bedeckt (Pyke, 1997).

Damit ergibt sich durch Stapelung der Thylakoidmembran eine Oberflächenvergrößerung von 20×70 bis 200×70 , also 1400 – 14000. Eine LHCII-Monomer-Stoffmenge von 6,3 - 63 nmol/ cm^2 Blattfläche ist erreichbar.

2.) Experimentelle Bestimmung der Stoffmenge

Von 3 Erbsenblättern (10 Tage alt) wurde eine je 1cm^2 große Blattfläche ausgeschnitten und das Chlorophyll mit Hilfe von 80% Aceton (durch 0,2 mM Hepes, pH 7 stabilisiert) extrahiert. Der Chlb-Gehalt wurde nach Porra *et al.* (1989) photometrisch bestimmt und lag bei $8,3 \pm 0,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Blattfläche. Da der größte Teil des Chlb an LHCII gebunden vorliegt, wurde von der Chlb-Menge auf die LHCII-Menge zurückgerechnet. 6 Chlb entsprechen dabei einem LHCII-Monomer. Eine LHCII-Monomer-Stoffmenge von 1,5 nmol/ cm^2 wurde auf diese Weise detektiert.

9.2 Ermittlung der potentiellen Energiekonversionseffizienz höherer Pflanzen

Prinzip

Um die erreichbare Energiekonversion von Solarzellen (vgl. Kapitel 1.4.2) mit der in der Natur verwirklichten Effizienz der Solarnutzung zu vergleichen, wurde das Verhältnis von pflanzlicher Energiespeicherung in Form des ersten stabilen Ladungstrennungsprodukts des PSII, Plastochinon B, zu auftreffender Sonnenenergie gebildet.

Methode

Als das auf die Pflanze auftreffende Sonnenlicht wurde das AM1.5-Spektrum (normiert auf eine Lichteinstrahlung von $100 \text{mW}/\text{cm}^2$, vgl. Tabelle 1.1) verwendet. Das Spektrum wurde über den Bereich von 350-750 nm integriert und stellte nachfolgend die eingestrahelte Leistung pro Flächeneinheit (in mW/cm^2) dar.

Es wurde nachfolgend postuliert, daß bei einer ausreichend hohen Chlorophyllkonzentration in der Pflanze das gesamte Licht der Wellenlängen von 350-500 nm und von 650-690 nm genutzt werden kann, in der Grünücke und im Naheinfrarotbereich dagegen keine Absorption stattfindet. Dies ist eine starke Vereinfachung der Pigmentabsorption und stellt daher nur eine Näherung dar.

Zur photochemischen Ladungstrennung ist eine Sonneneinstrahlung von ca. 175 kJ/mol Photonen notwendig, was einer Potentialdifferenz von 1,8 eV entspricht und durch Lichtabsorption von 670 nm erreicht wird. Photonen größeren Energiegehalts können von den Lichtsammelantennen auch absorbiert werden, jedoch wird von den Photonen nur der Energiegehalt von 175 kJ/mol genutzt, darüber hinausgehende Energie wird in Form von Wärme abgegeben. Um daher den Anteil der zur Ladungstrennung genutzten Sonneneinstrahlung zu bestimmen, wurde das AM1.5-Spektrum mit dem photochemisch nutzbaren Energiegehalt verrechnet:

$$\text{Photochemisch nutzbare Leistung} = \int_{350 \text{ nm}}^{500 \text{ nm}} 175 \text{ kJ/mol} \cdot \frac{I [\text{in nm}]}{119.000 \text{ kJ/mol}} \cdot \text{eingestrahlte Leistung} [\text{in mW/cm}^2/\text{nm}] +$$

$$\int_{650 \text{ nm}}^{690 \text{ nm}} 175 \text{ kJ/mol} \cdot \frac{I [\text{in nm}]}{119.000 \text{ kJ/mol}} \cdot \text{eingestrahlte Leistung} [\text{in mW/cm}^2/\text{nm}]$$

Die photochemisch nutzbare Leistung als Anteil an der eingestrahkten Leistung betrug 37%. Dieser Wert reduzierte sich noch einmal um 45% durch den Verlust der aufgenommenen Energie in der Pflanze bis zur Etablierung einer stabilen Ladungstrennung. Bei der primären Ladungstrennung im speziellen Paar des PSII-Reaktionszentrum wird eingestrahkte Energie von 175 kJ/mol genutzt, jedoch reduziert sich diese potentiell abgreifbare Energie bis auf 96 kJ/mol bis zur Bildung des reduzierten Plastochinon B.

9.3 Veränderung der Energietransfereffizienz bei Vorlage mehrerer Donoren oder mehrerer Akzeptoren

Der Energietransfer nach Förster beschreibt den energetischen Übergang in einem System aus einem Donor und einem Akzeptor. In den Versuchen dieser Arbeit wurde jedoch mit dem LHCII als Energiedonor bestehend aus 8 Chla und damit 8 potentiellen Donoren gearbeitet. Dies bedeutet eine Veränderung der Energietransferformel nach Hasselbacher *et al.* (1984) bzw. nach Berechnungen von W.Erker (pers. Mitteilung).

f = Fluoreszenzquantenausbeute vom Donor (D) bei Energietransfer auf den Akzeptor (A)

f_0 = Fluoreszenzquantenausbeute von D ohne Energietransfer auf A

ET = Energietransfereffizienz = $1 - \frac{f}{f_0}$

R_0 = försterkritischer Abstand

R = molekularer Abstand zwischen D und A

1.) Energietransfer in einem System aus einem Donor und einem Akzeptor:

$$f = \frac{f_0}{1 + \left(\frac{R_0}{R}\right)^6}$$

$$\frac{f}{f_0} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_0}{R}\right)^6}$$

$$1 - ET = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_0}{R}\right)^6}$$

$$\Rightarrow R_o = \left[\left(\frac{1}{1 - ET} - 1 \right) \cdot R^6 \right]^{1/6}$$

2.) Energietransfer in einem System aus mehreren Donoren und einem Akzeptor (veranschaulicht anhand eines Systems aus 2 D und 1 A ($i = 2$))

$$f = \frac{1}{D} \sum_i \frac{f_0}{1 + \left(\frac{R_0}{R_i}\right)^6} = \frac{1}{2} \frac{f_0}{1 + \left(\frac{R_0}{R_1}\right)^6} + \frac{1}{2} \frac{f_0}{1 + \left(\frac{R_0}{R_2}\right)^6}$$

Wenn $R_1 = R_2$:

$$1 - ET = \frac{1}{2} \frac{1}{1 + \left(\frac{R_0}{R}\right)^6} + \frac{1}{2} \frac{1}{1 + \left(\frac{R_0}{R}\right)^6} = \frac{2}{2 \left[1 + \left(\frac{R_0}{R}\right)^6 \right]} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_0}{R}\right)^6}$$

$$\Rightarrow R_o = \left[\left(\frac{1}{1 - ET} - 1 \right) \cdot R^6 \right]^{1/6}$$

3.) Energietransfer in einem System aus einem Donor und mehreren Akzeptoren (veranschaulicht anhand eines Systems aus 1 D und 2 A ($j = 2$))

$$f = \frac{f_0}{1 + \sum_j^A \left(\frac{R_0}{R_j}\right)^6} = \frac{f_0}{1 + \left(\frac{R_0}{R_1}\right)^6 + \left(\frac{R_0}{R_2}\right)^6}$$

Wenn $R_1 = R_2$:

$$f = \frac{f_0}{1 + \left(\frac{R_0}{R}\right)^6 + \left(\frac{R_0}{R}\right)^6} = \frac{f_0}{1 + 2\left(\frac{R_0}{R}\right)^6}$$

$$1 - \text{ET} = \frac{1}{1 + 2\left(\frac{R_0}{R}\right)^6}$$

$$\Rightarrow R_o = \left[\left(\frac{1}{1 - \text{ET}} - 1 \right) \cdot \frac{R^6}{2} \right]^{1/6}$$

9.4 Abkürzungsverzeichnis

A	Akzeptor
A280	Proteinabsorptionsmessung bei 280 nm
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
B800	Proteinring des LH2 mit Bchl-Absorption bei 800 nm
B850	Proteinring des LH2 mit Bchl-Absorption bei 850 nm
Bchl	Bakteriochlorophyll a
β ME	β -Mercaptoethanol
BMPA	Maleimidopropionsäure
BTI	NIR-Farbstoff mit aromatischem Amin als funktionelle Gruppe
Cab-Protein	Chlorophyll a/b-bindende Proteine
Car	Carotinoid
cb	Leitungsband
CHAPS	3-[(3 Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat
Chla	Chlorophyll a
Chlb	Chlorophyll b
CMC	kritische micelläre Konzentration
δ	Übergangsenergie eines Pigments
D	Donor
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	Desoxycholat
DTT	Dithiothreitol
ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient
E	Extinktion
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ET	Energietransfereffizienz
f	Fluoreszenzquantenausbeute
F	Farbstoff
HAP	Hydroxylapatit
HDA	1,6-Diaminohexan
„His6-tag“	Abfolge von 6 Histidinen im Protein
HRP	Meerrettich-Peroxidase-Ni-NTA
I	Interaktionsstärke zweier benachbarter Pigmente
IC	Interne Konversion
IPTG	Isopropyl- β -thio-galactopyranosid
ITO-Glas	Indium-Zinnoxid beschichtetes Glas
J	Überlappungsintegral zur Berechnung von R_0
κ^2	Geometrischer Faktor zur Determinierung der Dipol-Dipolorientierung in Donor-Akzeptor-Systemen
K	Orbitalüberlappung

9. Kapitel: Anhang

K_{ET}	Ratenkonstante eines Energietransfers
LH1	Bakterieller Light-harvesting complex I
LH2	Bakterieller Light-harvesting complex II
LHCII	Light-harvesting complex II, Hauptlichtsammelkomplex des PSII höherer Pflanzen
LHCII-BTI	LHCII, markiert mit Maleimido-BTI
LHCII-His6	LHCII mit His6-Sequenz im Apoprotein
Lhcb-1	Verwendetes LHCII-Apoprotein
Lhcb-1-BTI	LHCII-Apoprotein mit kovalent gebundenem Maleimido-BTI
LM	n-Dodecyl- β -D-maltosid
Maleimido-BTI	BTI mit einem Maleimid als funktionelle Gruppe
MBS	m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester
MG	Molekulargewicht
MV	Methylviologen
n	Brechungsindex
NaP	Natrium-Phosphatpuffer
NCS	Isothiocyanat-Gruppe
NG	n-Nonyl- β -D-glucosid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
Ni-NTA	Nickel-Chelat mit Nitrilotriessigsäure
NIR	Nahe-Infrarot-Bereich
OG	n-Octyl- β -D-glucosid
f	Fluoreszenzquantenausbeute
PA-Gel	Polyacrylamid-Gel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pLhcb1	Lhcb1 mit N-terminalem Precursor-Peptid
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
R	molekularer Abstand zwischen Energiedonor und -akzeptor
R_0	försterkritischer Abstand
RET	Resonanzenergietransfer
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Singulett-Niveau
SCE	Standardwasserstoffelektrode
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS7	Protein-Größenmarker
SMPB	Succinimidyl 4-(p-maleimidophenyl) butyrat
TCEP	Tris-(-2-cyanoethyl)-phosphin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
Tricin-	N-Tris(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton	Triton X-100
vb	Valenzband

9.5 Literaturverzeichnis

- K.Adachi, R.Yasuda, H.Noji, H.Itoh, Y.Harada, M.Yoshida, K.Kinosita Jr (2000): Stepping rotation of F1-ATPase visualized through angle-resolved single-fluorophore imaging, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **97**, 7243-7247
- R.Agarwal, B.P.Krueger, G.D.Scholes, M.Yang, J.Yom, L.Mets, G.R.Fleming (2000): Ultrafast energy transfer in LHC-II revealed by three-pulse photon echo peak shift measurements, *J.Phys.Chem.B*, **104**, 2908-2918
- T.Aizawa, N.Koganesawa, A.Kamakura, K.Masaki, A.Matsuura, H.Nagadome, Y.Terada, K.Kawano, K.Nitta (1998): Adsorption of human lysozyme onto hydroxyapatite - Identification of its adsorbing site using site-directed mutagenesis, *FEBS Lett.*, **422**, 175-178
- J.F.Allen (1992): How does protein phosphorylation regulate photosynthesis?, *TIBS*, **17**, 12-17
- A.Ambrose, R.W.Wagner, P.D.Rao, J.A.Riggs, P.Hascoat, J.R.Diers, J.Seth, R.K.Lammi, D.F.Bocian, D.Holten und J.S.Lindsey (2001): Design and synthesis of porphyrin-based optoelectronic gates, *Chem.Mater.*, **13**, 1023-1034
- J.B.Ashbury, R.J.Ellingson, H.N.Ghosh, S.Ferrere, A.J.Nozik, T.Lian (1999): Femtosecond IR study of excited-state relaxation and electron-injection dynamics of Ru(dcbpy)(2)(NCS)(2) in solution and on nanocrystalline TiO₂ and Al₂O₃ thin film, *J.Phys.Chem.B*, **103**, 3110-3119
- F.M.Ausubel, R.Brent, R.E.Kingston, D.D.Moore, J.G.Seidman, J.A.Smith, K.Struhl (Edit.) (1995): Short protocols in molecular biology, 3rd edition, *John Wiley & Sons, Inc., USA*
- U.Bach, D.Lupo, P.Comte, J.E.Moser, F.Weissörtel, J.Salbeck, H.Spreitzer, M.Grätzel (1998): Solid-state dye-sensitized mesoporous TiO₂ solar cells with high photon-to-electron conversion efficiencies, *Nature*, **395**, 583-585
- M.A.Bopp, Y.Jia, L.Li, R.J.Cogdell, R.M.Hochstrasser (1997): Fluorescence and photobleaching dynamics of single light-harvesting complexes, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **94**, 10630-10635
- M.A.Bopp, A.Sytnik, T.D.Howard, R.J.Cogdell, R.M.Hochstrasser (1999): The dynamics of structural deformations of immobilized single light-harvesting complexes, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **96**, 11271-11276
- K.Bouzek und L.Kavan (1999): Heat losses in grätzel solar cells, *Solar Energy Materials & Solar Cells*, **57**, 359-371

- B.Burfeindt, T.Hannappel, W.Storck, F.Willig (1996): Measurement of temperature-independent femtosecond interfacial electron transfer from an anchored molecular electron donor to a semiconductor as acceptor, *J.Phys.Chem.*, **100**, 16463-16465
- P.J.G.Butler und W.Kühlbrandt (1988): Determination of the aggregate size in detergent solution of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex from chloroplast membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3797-3801
- Calbiochem@Biochemicals (1997): A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry, *Calbiochem-Novabiochem Corporation*
- K.V.Cammarata und G.W.Schmidt (1992): In vitro reconstitution of a light-harvesting gene product: deletion mutagenesis and analyses of pigment binding, *Biochemistry*, **31**, 2779-2789
- C.R.Cantor und P.R.Schimmel (1980), Biophysical Chemistry, Band III, *Freeman, W. H. & Company*
- N.J.Cherepy, G.P.Smestad, M.Grätzel, J.Z.Zhang (1997): Ultrafast electron injection: Implications for a photoelectrochemical cell utilizing an anthocyanin dye-sensitized TiO₂ nanocrystalline electrode, *J.Phys.Chem.B*, **101**, 9342-9351
- W.W.Christie (1982), Lipid analysis, 2nd Edition, *Pergamon press*
- J.P.Connelly, M.G.Müller, R.Bassi, R.Croce, A.R.Holtzwarth (1997): Femtosecond transient absorption study of carotenoid to chlorophyll energy transfer in the light-harvesting complex II of photosystem II, *Biochemistry*, **36**, 281-287
- M.Conti, G.Falini, B.Samori (2000): How strong is the coordination bond between a histidine tag and Ni-nitritoltriacetate? An experiment of mechanochemistry on single molecules, *Angew.Chem.Int.Ed.*, **39**, 215-218
- R.Croce, M.G.Müller, R.Bassi, A.R.Holtzwarth (2001): Carotenoid-to-chlorophyll energy transfer in recombinant major light-harvesting complex (LHCII) of higher plants. I. femtosecond transient absorption measurements, *Biophys. J.*, **80**, 901-915
- R.Croce, R.Remelli, C.Varotto, J.Breton, R.Bassi (1999): The neoxanthin binding site of the major light harvesting complex (LHCII) from higher plants, *FEBS-Lett.*, **456**, 1-6
- H.Deng, Z.Lu, H.Mao, H.Xu (1997): The liquid junction cell based on the nanostructured TiO₂ electrode sensitized with zinc tetrasulfonated phthalocyanine, *Chem.Phys.*, **221**, 323-331
- F.T.H.den Hartog, C.van Papendrecht, U.Störkel, S.Völker (1999): Protein dynamics in photosystem II complexes of green plants studied by time-resolved hole-burning, *J.Phys.Chem.B*, **103**, 1375-1380

- M.Dong, L.G.Baggetto, P.Falson, M.Le Maire, F.Penin (1997): Complete removal and exchange of sodium dodecyl sulfate bound to soluble and membrane proteins and restoration of their activities, using ceramic hydroxyapatite chromatography, *Anal.Biochem.*, **247**, 333-341
- B.W.Dreyfuss und J.P.Thornber (1994): Assembly of the light-harvesting complexes (LHCs) of photosystem II. Monomeric LHC IIb complexes are intermediates in the formation of oligomeric LHC IIb complexes, *Plant Physiol.*, **106**, 829-839
- R.H. Fairclough und C.R.Cantor (1978): The use of singlet-singlet energy transfer to study macromolecular assemblies, *Methods Enzymol.*, **48**, 347-379
- A.Fender (2001): Stabilisierung der Chlorophyll a/b bindenden Lichtsammelantenne LHCII, Diplomarbeit in der AG Paulsen, Universität Mainz
- S. Ferrere, A. Zaban, B.A.Gregg (1997): Dye sensitization of nanocrystalline tin oxide by perylene derivatives, *J.Phys.Chem.B*, **101**, 4490-4493
- H.Fey (2001): Klassifizierung von Chlorophyll-Bindungsstellen des rekombinanten Lichtsammelkomplexes LHCII hinsichtlich ihrer relativen Affinitäten gegenüber Chlorophyll a und Chlorophyll b, Diplomarbeit in der AG Paulsen, Universität Mainz
- S.Folli, P.Westermann, D.Braichotte, A.Pèlerin, G.Wagnières, H.van den Bergh, J.-P.Mach (1994): Antibody-Indocyanin conjugates for immunophotodetection of human squamous cell carcinoma in nude mice, *Cancer Research*, **54**, 2643-2649
- M.Furuichi, E.Nishimoto, T.Koga, S.Yamashita (2000): Time-resolved fluorescence studies on the internal motion of chlorophyll a of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex in lipid membranes, *Bioscience biotechnology and biochemistry*, **64**, 1623-1627
- C.C.Gradinaru, S.Özdemir, D.Gülen, I.H.M.van Stokkum, R.van Grondelle, H.van Amerongen (1998): The flow of excitation energy in LHCII monomers: implications for the structural model of the major plant antenna, *Biophys. J.*, **75**, 3064-3077
- C.C.Gradinaru, I.H.M.van Stokkum, A.A.Pascal, R.van Grondelle, H.van Amerongen, *J.Phys.Chem.*, in press
- N.N.Greenwood und A.Earnshaw (1990), *Chemie der Elemente, VCH Weinheim*
- D.Gust, T.A.Moore, A.L.Moore (2001): Mimicking photosynthetic solar energy transduction, *Acc.Chem.Res.*, **34**, 40-48
- A.Hagfeldt und M.Grätzel (2000): Molecular photovoltaics, *Acc.Chem.Res.*, **33**, 269-277

- K.Hara, K.Sayama, Y.Ohga, A.Shinpo, S.Suga, H.Arakawa (2001): A coumarin-derivative dye sensitized nanocrystalline TiO₂ solar cell having a high solar-energy conversion efficiency up to 5.6%, *Chem. Commun.*, **6**, 596-570
- C.A.Hasselbacher, R.L.Street, T.G.Dewey (1984): Resonance energy transfer as a monitor of membran protein domain segregation: application to the aggregation of bacteriorhodopsin reconstituted into phospholipid vesicles, *Biochemistry*, **23**, 6445-6452
- R.A.Haycock, A.Yartsev, U.Michelsen V.Sundström, C.A.Hunter (2000): Self-assembly of pentameric porphyrin light-harvesting antennae complexes, *Angew.Chem.Int.Ed.*, **39**, 3616-3619
- S.Hobe, S.Prytulla, W.Kühlbrandt, H.Paulsen (1994): Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll *a/b* complex, *EMBO journal*, **13**, 3423-3429
- S.Hobe (1995): Trimerisierung des in-vitro-rekonstituierten Lichtsammelkomplexes höherer Pflanzen und spektroskopische Untersuchungen zur Pigmentorganisation, Dissertation, *Verlag Mainz*
- S.Hobe, R.Förster, J.Klingler, H.Paulsen (1995): N-proximal sequence motif in light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein is essential for the trimerization of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex, *Biochemistry*, **34**, 10224-10228
- F.O.Holtrup, G.R.J.Müller, H.Quante, S.De Feyter, F.C.De Schryver, K.Müllen (1997): Terrylenimides: new NIR fluorescent dyes, *Chem.Eur.J.*, **3**, 219-225
- S.Y.Huang, G.Schlichthörl, A.J.Nozik, M.Grätzel, A.J.Frank(1997): Charge recombination in dye-sensitized nanocrystalline TiO₂ solar cells, *J.Phys.Chem.B*, **101**, 2576-2582
- C.Huschenbett, laufende Doktorarbeit in der AG Paulsen, Universität Mainz
- Y.Ishii, T.Yoshida, T.Funatsu, T.Wazawa, T.Yanagida (1999): Fluorescence resonance energy transfer between single fluorophores attached to a coiled-coil protein in aqueous solution, *Chemical Physics* **246**, 163-173
- C.Janiak, T.M.Klapötke, H.-J.Meyer (1999), *Moderne Anorganische Chemie, de Gruyter, Berlin*
- S.Jansson (1994): The light-harvesting chlorophyll *a/b* binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1184**, 1-19
- R.C.Jennings, R.Bassi, G.Zucchelli (1996): Antenna structure and energy transfer in higher plant photosystems, *topics in current chemistry*, **177**, 162-177
- L.Jullien, J.Canceill, B.Valeur, E.Bardez, J.-P.Lefèvre, J.-M.Lehn, V.Marchi-Artzner, R.Pansu (1996): Multichromophoric cyclodextrine. 4. light conversions by antenna effect, *J.Am.Chem.Soc*, **118**, 5432-5442

- G.A.Karlin-Neumann, B.D.Kohorn, J.P.Thornber, E.M.Tobin (1985): A chlorophyll a/b-protein encoded by a gene containing an intron with characteristics of a transposable element, *Journal of Molecular and Applied Genetics*, **3**, 45-61
- A.Kashiwada, N.Nishino, Z.Y.Wang, T.Nozawa, M.Kobayashi, M.Nango (1999): Molecular assembly of bacteriochlorophyll *a* and its analogues by synthetic 4 α -helix polypeptides *Chem.lett.*, 1301-1302
- A.Kashiwada, H.Watanabe, T.Tanaka, M.Nango (2000): Molecular assembly of zinc bacteriochlorophyll *a* by synthetic hydrophobic 1 α -helix polypeptides, *Chem.lett.*, 24-25
- A.Kay und M.Grätzel (1993): Artificial photosynthesis. 1. photosensitization of TiO₂ solar cells with chlorophyll derivatives and related natural porphyrins, *J.Phys.Chem.*, **97**, 6272-6277
- A.Kay, R.Humphry-Baker, M.Grätzel (1994): Artificial photosynthesis. 2. investigations on the mechanisms of photosensitization of nanocrystalline TiO₂ solar cells by chlorophyll derivatives, *J.Phys.Chem.*, **98**, 952-959
- F.J.Kleima, C.C.Gradinaru, F.Calkoen, I.H.M.van Stokkum, R.van Grondelle, H.van Amerongen (1997): Energy transfer in LHCII monomers at 77K studied by sub-picosecond transient absorption spectroscopy, *Biochemistry*, **36**, 15262-15268
- F.J.Kleima, S.Hobe, F.Calkoen, M.L.Urbanus, E.J.G.Peterman, R.van Grondelle, H.Paulsen, H.van Amerongen (1999): Decreasing the chlorophyll a/b ratio in reconstituted LHCII: Structural and functional consequences, *Biochemistry*, **38**, 6587-6596
- G.Kodis, P.A.Liddell, L.de la Garza, P.C.Clausen, J.S.Lindsey, A.L.Moore, T.A.Moore, D.Gust (2001): Efficient energy transfer and electron transfer in an artificial photosynthetic antenna-reaction center complex, *J.Phys.Chem.B*, in press
- Z.Krupa, N.P.A.Huner, J.P.Williams, E.Maissan, D.R.James (1987): Development at cold-hardening temperatures. The structure and composition of purified rye light harvesting complex II, *Plant Physiol.*, **84**, 19-24
- D.Kuciauskas, P.A.Liddell, S.Lin, T.E.Johnson, S.J.Weghorn, J.S.Lindsey, A.L.Moore, T.A.Moore, D.Gust (1999): An artificial photosynthetic antenna-reaction center complex, *J.Am.Chem.Soc*, **121**, 8604-8614
- W.Kühlbrandt, D.N.Wang, Y.Fujiyoshi (1994): Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography, *Nature*, **367**, 614-621
- A.Kuttkat, R.Grimm, H.Paulsen (1995): Light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein inserted into isolated thylakoids binds pigments and is assembled into trimeric light harvesting complex, *Plant physiol*, **109**, 1267-1276
- U.K.Laemmlli (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685

S.A.Latt, H.T.Cheung, E.R.Blout (1965): Energy transfer. A system with relatively fixed donor-acceptor separation, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 995-1003

A.L.C.Lee und J.P.Thornber (1995): Analysis of the pigment stoichiometry of pigment-protein complexes from barley (*Hordeum vulgare*) - The xanthophyll cycle intermediates occur mainly in the light-harvesting complexes of photosystem I and photosystem II, *Plant Physiol.*, **107**, 565-574

D.Leupold, H.Lockstein, P.Hoffmann (1999): Structure-function relationships in the higher plant photosynthetic antenna complex LHC II as revealed by non-linear laser spectroscopy - the problem of „chlorophyll forms“, *Trends in Photochem.Photobiol.*, **6**, 43-52

K.Licha, B.Riefke, V.Ntziachristos, A.Becker B.Chance, W.Semmler (2000): Hydrophilic cyanine dyes as contrast agents for near-infrared tumor imaging: synthesis, photophysical properties and spectroscopic *in vivo* characterization, *Photochem.Photobiol.*, **72**, 392-398

V.S.-Y.Lin, S.G.DiMugno, M.J.Therien (1994): Highly conjugated, acetylenyl bridged porphyrins: New models for light-harvesting antenna systems, *Science*, **264**, 1105-1111

M.Lion, laufende Diplomarbeit in der AG Paulsen, Universität Mainz

M.Lipowska, G.Patony, L.Strekowski (1993): New near-infrared cyanine dyes for labelling of proteins, *Synth. Commun.*, **23**, 3087-3094

F.Lottspeich und H.Zorbas, Hrsg.(1998), Bioanalytik, *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*

G.McDermott, S.M.Prince, A.A.Freer, A.M., A.M.Hawthornthwaitelawless, M.Z.Papiz, R.J.Cogdell, N.W.Isaacs (1995): Crystal-structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria, *Nature*, **374**, 517-521

A.Metz und R.Hezel (2001): Easy-to-fabricate 20% efficient large-area silicon solar cells, *Solar Energy Materials & Solar Cells*, **65**, 325-330

V.Mick (2000): Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur Expression eines Chlorophyll a/b-bindenden Lichtsammlerproteins in transgenen Cyanobakterien, Diplomarbeit in der AG Paulsen, Universität Mainz

T.Miyatake, H.Tamiaki, A.R.Holzwarth, K.Schaffner (1999): Self-assembly of synthetic zinc chlorins in aqueous microheterogeneous media to an artificial supramolecular light-harvesting device, *Helvetica Chimica Acta*, **82**, 797-810

- M.A.Miller, R.K.Lammi, S.Prathapan, D.Holton, J.S.Lindsey (2000): A tightly coupled linear array of perylene, bis(porphyrin), and phthalocyanine units that functions as a photoinduced energy-transfer cascade, *J.Org.Chem.*, **65**, 6634-6648
- K.Mukai, S.Abe, H.Sumii(1999): Theory of rapid excitation-energy transfer from B800 to optically-forbidden exciton states of B850 in the antenna system LH2 of photosynthetic purple bacteria, *J.Phy.Chem.B*, **103**, 6096-6102
- R.B.Mujumdar, L.A.Ernst, S.R.Mujumdar, C.J.Lewis, A.S.Waggoner (1993): Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters, *Bioconjugate Chem.*, **4**, 105-111
- Md.K.Nazeeruddin, R.Humphry-Baker, M.Grätzel, B.A.Murrer (1998): Efficient near IR sensitization of nanocrystalline TiO₂ films by ruthenium phthalocyanines, *Chem.Commun.*, **6**, 719-720
- Md.K. Nazeeruddin, A. Kay, I. Rodicio, R. Humphry-Baker, E.Müller, P.Liska, N.Vlachopoulos, M.Grätzel (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, *J.Am.Chem.Soc.*, **115**, 6382-6390
- Md.K. Nazeeruddin, P.Pechy, T.Renouard, S.M.Zakeeruddin, R.Humphry-Baker, P.Comte, P.Liska, L.Cevey, E.Costa, V.Shklover, L.Spiccia, G.B.Deacon, C.A.Bignozzi, M.Grätzel: (2001): Engineering of efficient panchromatic sensitizers for nanocrystalline TiO₂-based solar cells, *J.Am.Chem.Soc.*, **123**, 1613-1624
- A.Nilsson, D.Stys, T.Drakenberg, M.D.Spangfort, S.Forsén, J.F.Allen (1997): Phosphorylation controls the three-dimensional structure of plant light harvesting complex II, *J.Biol.Chem.*, **272**, 18350-18357
- H.Noji, R.Y.E.M.Yoshida, E.K.Kinosita Jr (1997): Direct observation of the rotation of F₁-ATPase, *Nature*, **386**, 299 - 302
- W.Nultsch (1991), Allgemeine Botanik, 9. Auflage, *Thieme Verlag Stuttgart*
- S.Nußberger. J.P.Dekker, W.Kühlbrandt, B.M.van Bolhuis, R.van Grondelle, H.van Amerongen (1994): Spectroscopic characterization of three different monomeric forms of the main chlorophyll a/b binding protein from chloroplast membranes, *Biochemistry*, **33**, 14775-14783
- B. O'Regan (1998): Dye-sensitized n-p heterojunctions of titanium dioxide and copper thiocyanate, a new interface for photoinduced charge separation, Dissertation an der University of Washington, Chair Martin Gouterman, *Dissertation Abstract International*, **59**

- B.O'Regan und M.Grätzel (1991): A low-cost, high-efficiency solar cell based on dye-sensitized colloidal TiO₂ films, *Nature*, **353**, 737-740
- O.Pänke, K.Gumbiowski, W.Junge, S.Engelbrecht (2000): F-ATPase: specific observation of the rotating c subunit oligomer of EF₀EF₁, *FEBS Lett.*, **472**, 34-38
- N.-G.Park, J.van de Lagemaat, A.J.Frank (2000): Comparison of dye-sensitized rutile- and anatase-based TiO₂ solar cells, *J.Phys.Chem.B*, **104**, 8989-8994
- H.Paulsen, B.Finkenzeller, N.Kühlein (1993): Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein, *Eur.J.Bioch.*, **215**, 809-816
- H.Paulsen und S.Hobe (1992): Pigment-binding properties of mutant light-harvesting chlorophyll-*a/b*-binding protein, *Eur. J. Biochem.*, **205**, 71-76
- H.Paulsen, U.Rümler, W.Rüdiger (1990): Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein overexpressed in *E. coli*, *Planta*, **181**, 204-211
- E.J.G.Petermann, R.Monshouwer, I.H.M.van Stokkum, R.van Grondelle, H.van Amerongen (1997): Ultrafast singlet excitation transfer from carotenoids to chlorophylls via different pathways in light-harvesting complex II of higher plants, *Chem.Phys.Lett*, **264**, 279-284
- J.Pieper, M.Rätsep, R.Janowiak, H.-D.Irrgang, J.Voigt, G.Renger, G.J.Small (1999): Q_y-level structure and dynamics of solubilized light-harvesting complex II of green plants: pressure and hole burning studies, *J.Phys.Chem.A*, **103**, 2412-2421
- R.J.Porra, W.A.Thompson, P.E.Kriedemann (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, *Biochim.Biophys.Acta*, **975**, 384-394
- K.A.Pyke (1997): The genetic control of plastid division in higher plants, *American journal of botany*, **84**, 1017-1027
- H.Quante, Y.Geerts, K.Müllen (1997): Synthesis of soluble perylenebisimidine derivatives. Novel long-wavelength absorbing and fluorescent dyes, *Chem.Mater.*, **9**, 495-500
- Qiagen (2000): QIAexpress Detection and Assay Handbook
- J.M.Rehm, G.L.McLendon, Y.Nagasawa, K.Yoshihara, J.Moser, M.Grätzel (1996): Femtosecond electron-transfer dynamics at a sensitized dye-semiconductor (TiO₂) interface, *J.Phys.Chem.*, **100**, 9577-9578

- A.Reinero, E.M.Tobin (1991): An amino-proximal hydrophobic domain in the major light-harvesting chlorophyll a/b-protein is essential for membrane integration and protein stability, *Photosynth. Res.*, **30**, 25-33
- R.Remelli, C.Varotto, D.Sandonà, R.Croce und R.Bassi (1999): Chlorophyll binding to monomeric light-harvesting complex, *J.Biol.Chem.*, **274**, 33510-33521
- D.Reinsberg (2000): Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen zur Faltung und Pigmentbindung des Lichtsammlerproteins LHCII aus Photosystem II, Doktorarbeit in der AG Paulsen, Universität Mainz
- H.Rogl und W.Kühlbrandt (1999): Mutant trimers of light-harvesting complex II exhibit altered pigment content and spectroscopic features, *Biochemistry*, **38**, 16214-16222
- A.V.Ruban, P.J.Lee, M.Wentworth, A.J.Young, P.Horton (1999): Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light harvesting complexes, *J.Biol.Chem.*, **274**, 10458-10465
- J.Rupprecht (1998): Bindung von Chlorophyll-Derivaten und rekombinanten Lichtsammler-Komplexen als Lichtfänger an einen Halbleiter: Bau einer „grünen“ Solarzelle, Diplomarbeit in der AG Paulsen, Universität Mainz
- M.Sadrai, L.Hadel, R.R.Sauers, S.Husain, K.Krogh-Jespersen, J.D.Westbrook, G.R.Bird (1992): Lasing action in a family of perylene derivatives: singlet absorption and emission spectra, triplet absorption and oxygen quenching constants, and molecular mechanics and semiempirical molecular orbital calculations, *J.Phys.Chem.*, **96**, 7988-7996
- S.Savikhin, W.Xu, V.Soukoulis, P.R.Chitnis, W.S.Struve (1999): Ultrafast primary processes in photosystem I of the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803, *Biophys.J.*, **76**, 3278-3288
- R.Schödel, K.-D.Irrgang, J.Voigt, G.Renger (1998): Rate of carotenoid triplet formation in solubilized light-harvesting complex II (LHCII) from spinach, *Biophys.J.*, **75**, 3143-3153
- S.Schuler (2001), Diplomarbeit am 3. Physikalischen Institut, AG Wrachtrup, Universität Stuttgart
- G.R.Seely und J.S.Conolly (1986), in: Light emission by plant and bacteria, *Academic Press, Orlando USA*, 99-133
- H.Shinmori, T.Kajiwara, A.Osuka (2001): Supramolecular assembly of light harvesting porphyrin hexamer, *Tetrahedron Letters*, **42**, 2617-3620
- P.L.Southwick, L.A.Ernst, E.W.Tauriello, S.R.Parker, R.B.Mujumdar, S.R.Mujumdar, H.A.Clever, A.S.Waggoner (1990): Cyanine dye labeling reagents- Carboxymethylindocyanine Succinimidyl Esters, *Cytometry*, **11**, 418-430

- G.Steinberg-Yfrach, J.L.Rigaud, E.N.Durantini, A.L.Moore, D.Gust und T.A.Moore (1998): Light-driven production of ATP catalysed by F_0F_1 -ATP synthase in an artificial photosynthetic membrane, *Nature*, **392**, 479-482
- Strasburger (1991), Lehrbuch der Botanik, 33.Auflage, *Gustav Fischer Verlag Stuttgart*
- L.Stryer (1995): Biochemie, 4. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*
- U.Störkel, T.M.H.Creemers, F.T.H.den Hartog, S.Völker (1998): Glass versus protein dynamics at low temperature studied by time-resolved spectral hole burning, *Journal of Luminescence*, **76&77**, 327-330
- I.Stöcklin (2000): Ortsspezifische Fluoreszenz-Farbstoffmarkierung an rekombinanten Lichtsammeler-Proteinen (LHCII) und Messung des Energietransfers im rekonstituierten Komplex, Diplomarbeit in der AG Paulsen, Universität Mainz
- A.Sukenik, A.Livne, A.Neori, Y.Z.Yacobi, D.Katcoff (1992): Purification and characterization of a light-harvesting chlorophyll-protein complex from the marine eustigmatophyte *nannochloropsis* sp., *Plant Cell Physiol.* **33**, 1041-1048
- M.Sykora, K.A.Maxwell, J.M.DeSimone, T.J.Meyer (2000): Mimicking the antenna-electron transfer properties of photosynthesis, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **97**, 7687-7691
- Y.Tachibana, S.A.Haque, I.P.Mercer, J.R.Durrant und D.R.Klug (2000): Electron injection and recombination in dye sensitized nanocrystalline titanium dioxide films: a comparison of ruthenium bipyridyl and porphyrin sensitizer dyes, *J.Phys.Chem.B*, **104**, 1198-1205
- H.Tamiaki, T.Mijatake, R.Tanikaga, A.R.Holzwarth, K.Schaffner (1996): Selbstorganisation einer künstlichen Lichtsammel-Antenne: Energieübertragung von einem zinkhaltigen Chlorin auf ein Bacteriochlorin in einem supramolekularen Aggregat, *Angew.Chem.*, **108**, 772-774
- C.Tietz, F.Jelezko, U.Gerken, S.Schuler, A.Schubert, H.Rogl, J.Wrachtrup (2001): Single molecule spectroscopy on the light-harvesting complex II of higher plants, *Biophys.J.*, **81**, 556-562
- C.Tietz, U.Gerken, F.Jelezko, J.Wrachtrup (2000): Polarization measurements on single pigment-protein complexes, *Single Mol.*, **1**, 67-72
- C.Tietz, O.Chekhlov, A.Dräbenstedt, J.Schuster, J.Wrachtrup (1999): Spectroscopy on single light-harvesting complexes at low temperature, *J.Phys.Chem.B*, **103**, 6328-6333
- E.Topoglidis, A.E.G.Cass, G.Gilardi, S.Sadghi, N.Beaumot und J.R.Durrant (1998): Protein adsorption on nanocrystalline TiO_2 films: an immobilization strategy for bioanalytical devices, *Anal. Chem.*, **70**, 5111-5113

- E.Topoglidis, T.Lutz, R.L.Willis, C.J.Barnett, A.E.G.Cass, J.R.Durrant (2000): Protein adsorption on nanoporous TiO₂ films: a novel approach to studying photoinduced protein/electrode transfer reactions, *Faraday Discuss.*, **116**, 35-46
- G.Trinkunas, J.P.Connelly, M.G.Müller, L.Valkunas, A.R.Holzwarth (1997): Model for the excitation dynamics in the light-harvesting complex II from higher plants, *J.Phys.Chem.B*, **101**, 7313-7320
- N.J.Turro (1978), Modern Molecular Photochemistry, Columbia University, *The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc.*,
- H.van Amerongen und R.van Grondelle (2001): Understanding the energy transfer function of LHCII, the major light-harvesting complex of green plants, *J.Phys.Chem.B*, **105**, 604-617
- B.W.Van der Meer, G.Coker III, S.-Y.S.Chen (Edit) (1994): Resonance energy transfer, *John Wiley & Sons Inc.*
- R.van Grondelle (1985): Excitation energy transfer, trapping and annihilation in photosynthetic systems, *Biochim. Biophys. Acta*, **811**, 147-195
- E.van Hunnik, A.Livne, V.Pogenberg, E.Spijkerman, H.van den Ende, E.Garcia, D.Sütemeyer, J.W. de Leeuw (2001): Identification and localization of a thylakoid-bound carbonic anhydrase from the green algae Tetraedron minimum (Chlorophyta) and Chlamydomonas noctigama (Chlorophyta), *Planta*, **212**, 454-459
- A.M.van Oijen, M.Ketelaars, J.Köhler, T.J.Aartsma, J.Schmidt (1999): Unraveling the electronic structure of individual photosynthetic pigment-protein complexes, *Science*, **285**, 400-402
- H.M.Visser, F.J.Kleima, I.H.M.van Stokkum R.van Grondelle, H.van Amerongen (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, *Chem.Phys.*, **210**, 297-312
- S.I.E.Vulto, J.T.M.Kennis, A.M.Streltsov, J.Amesz, T.J.Aartsma (1999): Energy relaxation within the B850 absorption band of the isolated light-harvesting complex LH2 from *Rhodospseudomonas Acidophila* at low temperature, *J.Phys.Chem.B*, **103**, 878-883
- R.W.Wagner und J.S.Lindsey (1994): A molecular photonic wire, *J.Am.Chem.Soc.*, **116**, 9759-9760
- Z.-S.Wang, C.-H.Huang, Y.-Y.Huang, Y.-J.Hou, P.-H.Xie, B.-W. Zhang und H.-M.Cheng (2001): A highly efficient solar cell made from a dye-modified ZnO-covered TiO₂ nanoporous electrode, *Chem.Mater.*, **13**, 678-682

- Z.-S.Wang, F.-Y. Li, C.-H. Huang, L.Huang, M.Weil, L.-P.Jin, N.-Q.Li (2000): Photoelectric conversion properties of nanocrystalline TiO₂ electrodes sensitized with hemicyanine derivatives, *J.Phys.Chem.B*, **104**, 9676-9682
- J.Weidmann, T.Dittrich, E.Konstantinova, I.Laueremann, I.Uhlendorf und F.Koch (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
- J.Widengren und P.Schwille (2000): Characterization of photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye Cy5 by fluorescence correlation spectroscopy, *J.Phy.Chem.A*, **104**, 6416-6428
- M.Wiener (2000): Überexpression und *in vitro* Rekonstitution des Photosystem I - Lichtsammelkomplexes Lhca2, Diplomarbeit in der AG Paulsen, Universität Mainz
- H.Wolf (1998): Die Erstellung eines gereinigten, selektiv N-terminal Cyaninfarbstoff-markierten, rekombinanten Lichtsammelproteins, Diplomarbeit in der AG Paulsen, Universität Mainz
- M.Wu, P.M.Goodwin, W.P.Ambrose, R.A.Keller (1996): Photochemistry and fluorescence emission dynamics of single molecules in solution: B-Phycocerythrin, *J.Phys.Chem.*, **100**, 17406-17409
- L.Ying und X.S.Xie (1998): Fluorescence spectroscopy, exciton dynamics, and photochemistry of single allophycocyanin trimers, *J.Phys.Chem.B*, **102**, 10399-10409
- C.Yang, K.Kosemund, C.Cornet, H.Paulsen (1999): Exchange of pigment-binding amino acids in light-harvesting chlorophyll *a/b* protein, *Biochemistry*, **38**, 16205-16213
- D.-H.Yang, H.Paulsen, B.Andersson (2000): The N-terminal domain of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein complex (LHCII) is essential for its acclimative proteolysis, *FEBS Lett.*, **466**, 285-388
- H.Zer, M.Vink, N.Keren, H.G.Dilly-Hartwig, H.Paulsen, R.G.Herrmann, B.Andersson, I.Ohad (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, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **96**, 8277-8282