

**Pflanzlicher Lichtsammler (LHCII) in Hybridkomplexen
mit organischen Farbstoffen und anorganischen
Halbleiter-Nanokristallen (Quantum dots)**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Kristina Gundlach

geb. am 07. Dezember 1981 in Hamburg

Mainz, 2010

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 2010

I	Einleitung.....	1
1	Nutzung der Sonnenenergie.....	1
1.1	Die Photosynthese.....	1
1.2	Solarzellen.....	3
2	Der Lichtsammelkomplex II	5
2.1	Der LHCII <i>in vivo</i>	5
2.2	Struktur des LHCII	7
2.3	Der LHCII <i>in vitro</i>	8
3	Synthetische Komponenten	9
3.1	Fluoreszenzfarbstoffe	9
3.2	„Quantum dots“.....	11
4	Energietransfer.....	13
5	Zielsetzung der Arbeit.....	15
II	Material und Methoden	17
1	Geräte.....	17
2	Chemikalien und Längenstandards	19
2.1	Verwendete Chemikalien	19
2.2	Verwendete Längenstandards	19
3	Verwendete synthetische Komponenten.....	20
4	Verwendete organische Materialien	23
4.1	Verwendete Bakterienstämme und Vektor.....	23
4.2	Verwendete LHCII-Klone	23
4.3	Weitere organische Komponenten.....	24
5	Molekularbiologische Methoden	26
5.1	Nährmedien und Platten	26
5.2	Plasmidisolierung und DNA-Aufreinigung	27
5.3	Bestimmung der DNA-Konzentration	27
5.4	Mutagenesen.....	28
5.4.1	Klonierungsstrategie und Herstellung von R1Ch durch Punktmutation.....	28
5.4.2	Klonierungsstrategie der ZnS-Bindungsmutanten durch Insertion.....	29
5.4.2.1	Herstellung von Z8-C mit dem „Phusion Mutagenesis Kit“.....	30
5.4.2.2	Herstellung von A7-N und Z8-N mit dem „GC-rich“- Kit	31
5.5	Transformationen.....	32
5.5.1	Transformation von JM101-Zellen.....	32
5.5.2	Transformation von BL21 (DE3).....	33
5.5.3	Transformation von BL21 (DE3) pLysS	33
5.6	Restriktionsverdau	33
5.7	Sequenzierungen.....	34
5.8	Dauerkulturen	35
5.9	Agarose-Gelelektrophorese	35
6	Präparative biochemische Methoden.....	37
6.1	Isolation von Totalpigmentextrakt	37
6.2	Überexpression von LHCP und Isolation als „Inclusion Bodies“	38
6.2.1	Standardmäßige Überexpression und Isolation in JM101	38
6.2.2	Überexpression und Isolation von R1Ch	39

6.3	Farbstoffmarkierungen am LHCII	41
6.3.1	Herstellung von Farbstoffstammlösungen.....	41
6.3.2	Cysteinreaktive Markierung am Apoprotein	41
6.3.3	Cysteinreaktive Markierung am Pigment-Protein-Komplex	43
6.3.4	Aminoreaktive Markierung am Pigment-Protein-Komplex	43
6.3.5	„Native chemische Ligation“ am Apoprotein.....	45
6.3.6	Markierung von „His-tag“-Proteinen im SDS-PA-Gel	46
6.4	Proteinfällungen	47
6.4.1	Saure Acetonfällung	47
6.4.2	„Wasserfällung“	48
6.5	Präparative Gelelektrophorese	48
6.5.1	Herstellen des präparativen PA-Gels.....	49
6.5.2	Durchführung der präparativen Gelelektrophorese	50
6.5.3	Probenaufbereitung nach der präparativen Gelelektrophorese	50
6.6	Faltung des LHCII	51
6.6.1	Detergenz-Wechsel Rekonstitution.....	51
6.6.2	Trimerisierung in Liposomen.....	52
6.6.2.1	Integration von LHCII-Monomeren in Liposomen	52
6.6.2.2	Umgang mit „BioBeads“	53
6.6.3	Trimerisierung durch Affinitätschromatographie mit der Ni-Säule	54
6.7	Ultrazentrifugation des LHCII im Saccharosedichtegradienten	55
6.8	Trypsinverdau des LHCII.....	56
6.9	Butanolextraktion nach Martinson & Plumley (1995)	57
6.10	Aufkonzentrierung und Pufferwechsel	58
6.11	Interaktion von LHCII mit TiO ₂ -Platten	58
6.12	Versuche zur Bindung von QDs und LHCII.....	59
6.12.1	Herstellung von QD-Protein-Hybridkomplexen	59
6.12.2	Auftrennung von QD-LHCII-Hybridkomplexen durch Ultrazentrifugation.....	60
7	Analytische biochemische Methoden.....	61
7.1	Analytische Chromatographien.....	61
7.1.1	Analytische HPLC zur Charakterisierung von Pigmentgemischen	61
7.1.2	FPLC zur Trennung von verschiedenen Proteinpulationen	61
7.2	Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE)	62
7.2.1	Gießen der PA-Gele	63
7.2.1.1	PA-Gele nach Lämmli (1970).....	63
7.2.1.2	PA-Gele nach Schagger & von Jagow (1987).....	64
7.2.1.3	PA-Gradientengele nach Fling & Gregerson (1986).....	65
7.2.2	Denaturierende SDS-PAGE	66
7.2.3	Schwach denaturierende PAGE („grüne“ PAGE).....	67
7.2.4	Coomassiefärbung der aufgetrennten Proteine	68
7.2.5	Densitometrische Analysen mit der VersaDoc	69
7.3	Spektroskopische Methoden	69
7.3.1	UV-Vis Photometrie	70
7.3.1.1	Allgemeine Bestimmung der Konzentration	70
7.3.1.2	Bestimmung der Chlorophyll-Konzentration im Totalpigmentextrakt	71
7.3.1.3	LHCP-Konzentrationsbestimmung	71
7.3.1.4	Berechnung der Markierungsausbeute	71
7.3.2	Fluoreszenzspektroskopie	72
7.3.3	CD-Spektroskopie	73
7.3.3.1	„Steady-State“-Messungen	74
7.3.3.2	Stabilitätsmessungen.....	74

7.4	Energietransferberechnungen.....	75
7.4.1	Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten.....	75
7.4.2	Dekonvolution der Fluoreszenzemissionsspektren von Hybridkomplexen.....	76
7.4.3	Berechnung der beobachteten Energietransfereffizienz.....	77
7.4.4	Berechnung von Försterradien.....	78
7.4.5	Berechnung der erwarteten Energietransfereffizienz und Abstandsschätzungen.....	78
7.4.6	Berechnung von QD-Löschungskonstanten.....	79
7.4.7	Integrieren mit der Mittelpunktsregel.....	80
7.5	Berechnungen von apparenten QD-LHCII-Bindungskonstanten.....	80
III	Ergebnisse.....	81
1	Grünlückenfüllung des LHCII.....	81
1.1	Markierung von Einzel-Cystein Mutanten mit PDI-Mal.....	81
1.1.1	Markierungsbedingungen und –ausbeuten.....	82
1.1.2	Rekonstitution und Energietransfer von PDI-Mal markiertem S3Ch.....	87
1.2	Markierung von LHCII mit mehreren Farbstoffen.....	91
1.2.1	Markierung von Mehrfach-Cystein Mutanten.....	91
1.2.1.1	Markierung am rekonstituierten LHCII.....	92
1.2.1.2	Markierung von 3xCh mit PDI-Mal.....	96
1.2.1.3	Markierung von 3xCh mit Rho-Mal: Publikation I. Gundlach et al., Filling the 'green gap' of the major light-harvesting chlorophyll a/b complex by covalent attachment of Rhodamine Red, BBA, 1787, 1499-1504.....	97
1.2.1.4	Markierung von 4xCh mit verschiedenen Farbstoffen.....	113
1.2.2	Markierungen mit aminoreaktiven Farbstoffen.....	115
1.2.2.1	Optimierung der aminoreaktiven Markierungsreaktion.....	115
1.2.2.2	Charakterisierung der aminomarkierten LHCII-Trimere.....	117
1.2.2.3	Energietransfer und freier Farbstoff.....	120
1.2.2.4	Optimierung der Probenaufreinigung.....	122
2	Versuche mit Rylen-Akzeptorfarbstoffen.....	126
2.1	Markierung mit DNQDI.....	126
2.2	Markierung mit TDI-Mal.....	128
2.3	Versuche mit TMIMA.....	130
2.3.1	Markierung von S3Ch mit TMIMA.....	130
2.3.2	Rekonstitution und Energietransfer von TMIMA-S3Ch.....	132
2.3.3	Adsorption von LHCII an TiO ₂ mit und ohne TMIMA.....	134
3	„Neue“ Farbstoff-Protein-Interaktionen.....	136
3.1	„Native chemische Ligation“: Markierung mit einem Thioesterfarbstoff.....	136
3.1.1	Herstellung eines LHCII mit N-terminalem Cystein.....	136
3.1.2	Markierungsbedingungen und Aufreinigung.....	138
3.1.3	Rekonstitution und Energietransfer: Publikation II. Peneva et al. Site-specific incorporation of perylene into an N-terminal modified light-harvesting complex LHCII.....	141
3.2	PDI-NTA: Nachweis eines “His-Tags” in einem SDS-PA-Gel.....	155
4	Charakterisierung von QDs in wässriger Lösung.....	156
4.1	Spektroskopische Eigenschaften der verwendeten QDs.....	156
4.2	Verhalten der QDs in wässriger Lösung.....	157
5	Versuche zum Energietransfer von QD auf LHCII.....	159
5.1	Versuche mit Multishell-QDs und LHCII.....	159
5.1.1	Titrationenversuche.....	159
5.1.2	Untersuchungen des Energietransfermechanismus.....	161

5.2	Versuche mit 6xZnS-QDs und LHCII	162
5.2.1	Versuche mit 6xZnS-QDs mit Liponsäure	162
5.2.2	Versuche mit 6xZnS-QDs mit D-Penicillamin	164
6	Versuche zur Bindung von LHCII an QD	166
6.1	Herstellung der ZnS-Bindungsmutanten	166
6.1.1	Klonierungsstrategie und Mutagenese der ZnS-Bindungsmutanten	166
6.1.2	Überexpression und Rekonstitution der ZnS-Bindungsmutanten	168
6.2	QD-LHCII-Bindungsexperimente	170
6.2.1	Optimierung der Auftrennung durch Ultrazentrifugation	170
6.2.2	QD-Bindung unterschiedlicher LHCII-Mutanten	172
6.2.3	Erstellung von Bindungskurven	175
IV	Diskussion	177
1	Hybridkomplexe aus Farbstoffen und LHCII	177
1.1	Markierungen mit cysteinreaktiven Farbstoffen	177
1.1.1	Reaktionsbedingungen bei cysteinreaktiven Markierungen	177
1.1.2	Markierungspositionen und -methoden	179
1.2	Markierungen mit aminoreaktiven Farbstoffen	182
1.2.1	Wo binden die aminoreaktiven Farbstoffe?	182
1.2.2	Die Struktur des LHCII nach Markierungen mit aminoreaktiven Farbstoffen	185
1.3	Das Problem „freier Farbstoff“ bei der Markierung von rekonstituiertem LHCII	186
1.4	Kann die Grünlücke der LHCII-Absorption gefüllt werden?	188
1.4.1	Welche Markierungsmethode ist besser?	189
1.4.2	Energietransferbetrachtungen	190
1.4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	192
1.5	Markierungen mit Rylene Farbstoffen	192
1.5.1	Markierungsausbeute und Energietransfer	193
1.5.2	Verwendbarkeit von Akzeptor-Rylene Farbstoffen	197
1.5.3	Nutzung von TMIMA-LHCII in DSSCs	199
1.6	„Neue“ Farbstoff-LHCII-Interaktionen	201
1.6.1	„Native chemische Ligation“ mit dem LHCII	201
1.6.2	Detektion von „His-Tag“-Proteinen durch PDI-NTA	204
2	Hybridkomplexe aus Quantum Dots und LHCII	206
2.1	ZnS-Bindungsmutanten	206
2.2	Verhalten der verwendeten QDs in wässriger Lösung	207
2.3	Interaktionen zwischen QDs und LHCII	211
2.3.1	Wie bindet der LHCII an QDs?	211
2.3.2	Energietransferbetrachtungen	215
2.3.3	Welcher Ligand ist zu bevorzugen?	218
3	Allgemeine Schlussfolgerung und zukünftige Experimente	220
V	Zusammenfassung	222
VI	Literaturverzeichnis	224
VII	Anhang	236

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.1 Schema einer „Dye-sensitized solar cell“.	3
Abb. 1.2.1 Der PSII-Superkomplex.	5
Abb. 1.2.2 Darstellung der verschiedenen Funktionen des LHCII.	6
Abb. 1.2.3 Struktur des LHCII.	7
Abb. 1.2.4 Der LHCII <i>in vitro</i> .	9
Abb. 1.3.1 Wasserlösliches Perylendiimid als Rylenebeispiel.	10
Abb. 1.3.2 Aufbau von „Quantum dots“.	12
Abb. 1.4.1 Schematische FRET-Darstellung	14
Abb. 2.2.1 Verwendete DNA-Längenstandards	19
Abb. 2.2.2 Verwendete Proteinstandards.	20
Abb. 2.3.1 Strukturformeln der verwendeten QD-Liganden.	20
Abb. 2.3.2 Strukturformeln der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.	22
Abb. 2.4.1 Schematische Darstellung des Vektors pDS12-RBSII.	23
Abb. 2.5.1 Schema der Klonierungsstrategie für R1Ch.	29
Abb. 2.5.2 Schema der Klonierungsstrategie für die ZnS-Bindungsmutanten.	30
Abb. 2.6.1 Schema der Reaktion von Maleimiden mit Cysteinen.	42
Abb. 2.6.2 Schema der Reaktion von NHS-Estern mit deprotonierten Lysinen.	44
Abb. 2.6.3 Schema der Reaktion von Thioestern mit N-terminalen Cysteinen.	46
Abb. 2.6.4 Schema der Komplexbildung von Ni-NTA-Gruppen mit Histidinen.	47
Abb. 2.7.1 Berechnung von Markierungsausbeuten.	72
Abb. 3.1.1 Die Grünlücke des LHCII.	81
Abb. 3.1.2 Der Fluoreszenzfarbstoff PDI-Mal.	81
Abb. 3.1.3 Optimierung der Markierung von S3Ch mit PDI-Mal.	82
Abb. 3.1.4 Anionenaustauscher-Chromatographie von PDI-S3Ch.	84
Abb. 3.1.5 Anionenaustauscher-Chromatographie von unmarkiertem S3Ch.	85
Abb. 3.1.6 Verhalten von PDI-markiertem LHCII-Apoprotein in unterschiedlichen PAGE-Systemen.	86
Abb. 3.1.7 Charakterisierung von PDI-S3Ch Trimeren.	87
Abb. 3.1.8 Temperaturstabilität von PDI-S3Ch Trimeren.	88
Abb. 3.1.9 Nachweis von PDI in S3Ch-Trimeren.	89
Abb. 3.1.10 Energietransfer und Füllung der Grünlücke bei PDI-S3Ch Trimeren.	90
Abb. 3.1.11 Absorptionsspektrum von Rho-Mal markierten S3Ch Trimeren.	91
Abb. 3.1.12 Unterschiedliche cysteinreaktive Markierungsprotokolle.	92
Abb. 3.1.13 Markierungsausbeuten bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.	93
Abb. 3.1.14 Ausbeute korrekt gefalteter LHCII nach unterschiedlichen Rekonstitutionsbedingungen.	94
Abb. 3.1.15 Markierungsausbeuten bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.	95
Abb. 3.1.16 Absorptionsspektren von PDI-markierten 3xCh-Trimeren.	96
Abb. 3.1.17 Auftrennung von verschiedenen 4xCh Markierungen	113
Abb. 3.1.18 Grünlückenfüllung und Energietransfer von PDI- und Rho-markierten 4xCh-Trimeren.	114
Abb. 3.1.19 Markierungsausbeuten nach Reaktion von C3.2h-Trimeren mit PDI-NHS unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.	116
Abb. 3.1.20 Charakterisierung von aminomarkierten C3.2h-Trimeren.	117
Abb. 3.1.21 Temperaturstabilität von aminomarkierten C3.2h-Trimeren.	118
Abb. 3.1.22 Trypsinverdau mit aminomarkierten C3.2h-Trimeren.	119
Abb. 3.1.23 Energietransfer bei aminomarkierten C3.2h-Trimeren.	120
Abb. 3.1.24 Entfernung des überschüssigen Farbstoffs nach aminoreaktiver Markierung von C3.2h-Trimeren.	121
Abb. 3.1.25 Aufreinigung von aminoreaktiv markiertem C3.2h durch Ultrazentrifugation.	123
Abb. 3.1.26 Optimierte Markierung und Aufreinigung von Rho-C3.2h.	124
Abb. 3.1.27 Fluoreszenzspektren des optimal aufgereinigten Rho-C3.2h.	125

Abb. 3.2.1 Der Fluoreszenzfarbstoff DNQDI.....	126
Abb. 3.2.2 Ausbeuten der Markierung von S3Ch mit DNQDI.....	127
Abb. 3.2.3 Rekonstitution von DNQDI-S3Ch.....	128
Abb. 3.2.4 Markierung mit TDI.....	128
Abb. 3.2.5 Charakterisierung von TDI-S3Ch Monomeren.....	129
Abb. 3.2.6 Energietransfer bei TDI-S3Ch Monomeren.....	129
Abb. 3.2.7 Markierung von S3Ch mit TMIMA.....	131
Abb. 3.2.8 Absorption und Fluoreszenz von TMIMA.....	131
Abb. 3.2.9 Charakterisierung von TMIMA-S3Ch Monomeren.....	132
Abb. 3.2.10 Energietransfer bei TMIMA-S3Ch Monomeren.....	133
Abb. 3.2.11 Adsorption von LHCII an TiO ₂ mit und ohne TMIMA.....	134
Abb. 3.3.1 Überexpression von R1Ch in verschiedenen Bakterienstämmen.....	137
Abb. 3.3.2 Entfernung des GuHCl aus einem PDI-TE-Markierungsansatz.....	138
Abb. 3.3.3 Markierungs- und Proteinausbeuten nach unterschiedlichen Markierungsbedingungen von PDI-TE mit R1Ch.....	139
Abb. 3.3.4 Laufverhalten von PDI-R1Ch und Aufreinigungserfolg nach präparativer Gelelektrophorese.....	140
Abb. 3.3.5 Interaktion von PDI-NTA mit verschiedenen LHCII-Mutanten.....	155
Abb. 3.4.1 Absorption und Fluoreszenz von QDs mit verschiedenen Liganden.....	156
Abb. 3.4.2 Reproduzierbarkeit des Fluoreszenzverhaltens der QDs in wässriger Lösung..	157
Abb. 3.4.3 Einfluss der Pufferkomponenten auf die QD-Fluoreszenz.....	158
Abb. 3.5.1 Spektrale Überlappung von QD und LHCII.....	159
Abb. 3.5.2 Exemplarische Löschung der QD-Donorfluoreszenz und Berechnung der QD- Löschungskonstanten.....	160
Abb. 3.5.3 Untersuchung der LHCII-Fluoreszenz in Anwesenheit von Multishell-QDs.....	162
Abb. 3.5.4 Untersuchung der LHCII-Fluoreszenz in Anwesenheit von 6xZnS-QDs.....	163
Abb. 3.5.5 Fluoreszenz von DHLA-6xZnS-QDs in Anwesenheit von „His-Tag“-Proteinen..	163
Abb. 3.5.6 Energietransfer von DPA-6xZnS-QDs auf C3.2h-Trimere.....	164
Abb. 3.5.7 Fluoreszenz von DPA-6xZnS-QD in Anwesenheit von unpigmentiertem WSCP165	
Abb. 3.6.1 Mutagenese-PCR für die Herstellung der ZnS-Bindungsmutanten.....	167
Abb. 3.6.2 Vergleich der IB-Präparationen von ZnS-Bindungsmutanten und C79S.....	168
Abb. 3.6.3 Rekonstitution der ZnS-Bindungsmutanten.....	169
Abb. 3.6.4 Verhalten von LHCII bei der Auftrennung mit der Airfuge.....	170
Abb. 3.6.5 Optimierte QD-LHCII-Trennung durch Ultrazentrifugation in der Airfuge.....	171
Abb. 3.6.6 Bindung von Z8-N-Trimeren an unterschiedliche 6xZnS-QDs.....	173
Abb. 3.6.7 Bindung von verschiedenen LHCII-Klonen an unterschiedliche 6xZnS-QDs.....	174
Abb. 3.6.8 Einfluss von DTT auf A7-N und DHLA-QDs.....	175
Abb. 3.6.9 Erstellung von QD-LHCII-Bindungskurven.....	176
Abb. 4.1.1 Potentielle Markierungspositionen für aminoreaktive Farbstoffe.....	183
Abb. 4.1.2 LHCII-Fluoreszenzzuwachs in PDI-LHCII Hybridkomplexen.....	197

Tabellenverzeichnis

Tabelle II.1 Verwendete QDs	20
Tabelle II.2 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe	21
Tabelle II.3 Verwendete LHCII-Klone	24
Tabelle II.4 Eigenschaften der LHCII-Pigmente.....	25
Tabelle II.5 Verwendete Mutagenese-Primer	28
Tabelle II.6 PCR-Programm für die Herstellung von Z8-C.	30
Tabelle II.7 PCR-Programm für die Herstellung von A7-N und Z8-N.	31
Tabelle II.8 Verwendete Restriktionsenzyme.....	33
Tabelle II.9 Standardmäßiger Ansatz einer Sequenzier-PCR.....	34
Tabelle II.10 Verwendete Sequenzier-Primer.....	34
Tabelle II.11 PCR-Programm der Sequenzier-PCR.....	35
Tabelle II.12 Optimierte Variationen in der cysteinreaktiven Markierung am Apoprotein.....	42
Tabelle II.13 Zusammensetzung des PA-Gels bei der präparativen Gelelektrophorese.	49
Tabelle II.14 Verwendetes FPLC-Programm.	62
Tabelle II.15 Zusammensetzung der PA-Gele nach Lämmli (1970).....	64
Tabelle II.16 Zusammensetzung der PA-Gele nach Schägger und von Jagow (1987).	65
Tabelle II.17 Zusammensetzung der PA-Gradientengele.	66
Tabelle II.18 Laufparameter für denaturierende SDS-PAGE verschiedener Gelsysteme.....	66
Tabelle II.19 Verwendete VersaDoc-Einstellungen.....	69
Tabelle II.20 Verwendete Parameter bei Fluoreszenzmessungen.....	73
Tabelle III.1 QD-Löschungskonstanten für unterschiedliche LHCII-Mutanten.	161
Tabelle III.2 Sequenzen der ZnS-Bindungsmutanten	167
Tabelle IV.1 Försterradien (R_0) von Farbstoffen der Grünlückenfüllung und Chl <i>a</i> bzw. <i>b</i> . .	191
Tabelle IV.2 Försterradien (R_0) von TDI-Mal und LHCII.....	198
Tabelle IV.3 Apparente Bindungskonstanten für LHCII und DHLA-Mulitshell-QDs.	214
Tabelle IV.4 Försterradien (R_0) der verwendeten DHLA-QDs und LHCII.	216

I Einleitung

1 Nutzung der Sonnenenergie

„Sonne ist Energie“. In diesem einfachen Satz steckt das ganze Potential unserer Sonne, ohne die das Leben auf der Erde, wie wir es kennen, nicht möglich wäre. Sie ist für das warme Klima verantwortlich und liefert mit rund 120.000 auf der Erdoberfläche ankommenden Terrawatt, welches dem 6000fachen des weltweiten menschlichen Energieverbrauchs entspricht, den entscheidenden Energiebetrag für das Leben (Grätzel, 2009). Photosynthetisch aktive Organismen sind in der Lage, einen Teil dieser Lichtenergie in chemischer Energie zu speichern. Auf diese Weise produzieren sie 100 Milliarden Tonnen trockene Biomasse pro Jahr (Barber, 2009). Diese dient nicht nur direkt als Nahrung und somit als Grundlage für heterotrophe Lebensformen inklusive der Menschen, sondern ist zusätzlich über Jahrmillionen in fossilen Energieträgern gespeichert worden. Zurzeit werden rund 80% des weltweiten Energieverbrauchs durch diese fossilen Quellen gedeckt. Die Vorräte sind jedoch beschränkt und der Bedarf der Menschen steigt stetig. Es liegt daher nahe, es den Pflanzen nachzumachen und das immense Potential des Sonnenlichtes direkt zu nutzen. Die Erforschung von effizienten Solarzellen wird somit für die langfristige Energieversorgung der Menschheit entscheidend sein.

1.1 Die Photosynthese

Die Fähigkeit, allein durch die Sonnenenergie und mit Kohlendioxid (CO_2) als Kohlenstoffquelle leben zu können, wird als Photoautotrophie bezeichnet. Der zugrunde liegende Stoffwechselweg heißt analog Photosynthese. Die sogenannte oxygene Photosynthese entwickelte sich vor 3 Milliarden Jahren in Vorläufern heutiger Cyanobakterien. Sie waren die ersten Organismen, die für die Reduktion von CO_2 Wasser verwendeten. Dabei entstand sozusagen als unwichtiges Nebenprodukt elementarer Sauerstoff (= "Oxygenium"), welcher zuvor nicht in der Erdatmosphäre vorhanden war. Nun jedoch konnte die aerobe Atmung und damit höheres Leben entstehen (Canfield et al., 2006).

Durch Endosymbiose dieser Bakterien erhielten neben Grünalgen auch höhere Pflanzen die Fähigkeit zur oxygenen Photosynthese. Aus den aufgenommenen Bakterien entstanden die Chloroplasten, in welchen auch heute noch die Photosynthese abläuft (Barber, 2009). Chloroplasten besitzen neben einer doppelten Hüllmembran ein inneres abgeschlossenes Membransystem, die Thylakoide. Deren Matrix wird Stroma genannt. Die oxygene Photosynthese kann in zwei Reaktionen geteilt werden. In der lichtabhängigen Reaktion wird Sonnenenergie aufgenommen und durch die Reduktion von Nicotinamid-

adenindinucleotidphosphat (NADP^+) und die Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) gespeichert. In der anschließenden sogenannten Dunkelreaktion wird die so zwischengelagerte Energie benutzt, um organische Verbindungen aus anorganischem CO_2 und Wasser zu bilden. Während sich die Enzyme für letztere im Stroma befinden, findet die Lichtreaktion an bzw. in der Thylakoidmembran statt. Durch die hier stattfindende Lichtabsorption stellt sie den zentralen Schritt für die Nutzung der Sonnenenergie dar. Diese Absorption wird durch Chlorophylle (Chl), die sich in zahlreichen Pigment-Protein-Komplexen befinden, gewährleistet. Am wichtigsten sind hierbei spezielle Chl a, die sich in jedem Reaktionszentrum befinden. Diese geben nach Anregung jeweils ein Elektron ab, und durch die anschließende schnelle Weiterleitung der Elektronen über Redoxketten kommt es zu einer effizienten Ladungstrennung, die schließlich durch die zwischenzeitliche Energiespeicherung mit NADPH und ATP für die Dunkelreaktion nutzbar wird. Zurück bleiben Elektronendefizite, die je nach Reaktionszentrum unterschiedlich aufgefüllt werden. Am Photosystem II (PSII) wird dies durch die photolytische Spaltung des Wassers erreicht, das Photosystem I (PSI) erhält dagegen über eine Elektronentransportkette die vom Photosystem II abgegebenen Elektronen. Auf diese Weise sind die beiden Reaktionszentren miteinander verbunden.

Obwohl die Reaktionszentren potentiell direkt angeregt werden können, erhalten sie den Großteil ihrer Energie über die sogenannten Antennenkomplexe. Diese bestehen jeweils aus mehreren Photosystem-spezifischen Pigment-Protein-Komplexen, die sich um diese in der Thylakoidmembran anlagern. Durch ihre Pigmente absorbieren sie Licht und leiten dessen Energie an die Reaktionszentren weiter. Dadurch vermehren sie die Anzahl der Photonen, die für die Photosynthese verwendet werden können, und sind somit maßgeblich für die Effizienz des Stoffwechselweges verantwortlich.

Alle Pigment-Protein-Komplexe der höheren Pflanzen binden Chlorophylle und Carotinoide. Während die Carotinoide oft Schutzfunktionen einnehmen, sind die Chlorophylle die photosynthetisch aktiveren Farbstoffe. Ihre Absorptionseigenschaften führen zu der für uns so selbstverständlichen grünen Farbe von Pflanzen. Diese ist gleichbedeutend mit einer geringen Absorption von grünem Licht (500 – 600 nm) und es stellt sich die Frage, weshalb in der Evolution keine Pigmente in der oxygenen Photosynthese höherer Pflanzen eingebaut wurden, die das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichtes verwenden können. Tatsächlich bieten sich aber gerade Chlorophylle für die Photosynthese an, da sie auch bei geringer Lichtintensität leicht angeregt werden und somit Pflanzen auch unter solchen Bedingungen effektiv Photosynthese betreiben können (Nishio, 2000). Zusätzlich führt die geringe Absorption von 500 - 600 nm dazu, dass bei dickeren Blättern genügend Licht in untere Schichten gelangt und dann auch dort Reaktionszentren angeregt werden können

(Terashima et al., 2009). Dies ist besonders unter starker Sonneneinstrahlung und einer damit verbundenen Stresssituation für die Pflanzen von Vorteil.

Die Evolution hat in der oxygenen Photosynthese höherer Pflanzen somit mehrere Prinzipien verwirklicht, die für eine effiziente Nutzung der Sonnenenergie entscheidend sind. Dies ist zum einen eine schnelle Ladungstrennung, die eine ungewollte, schnelle Rekombination der Ladungen erschwert. Zum anderen ist es die Verwendung von Antennenkomplexen, die für eine optimale Absorption der Sonnenenergie sorgen.

1.2 Solarzellen

Mit Hilfe von Solarzellen nutzen auch wir Menschen Sonnenlicht direkt. Dabei können verschiedene Prinzipien verwendet werden. Heutige kommerziell genutzte Solarzellen funktionieren meistens auf Silizium-Basis und gehen auf ein Prinzip zurück, mit dem erstmals 1954 in den Bell Laboratorien, USA eine Solarzelle entstand. Diese hatte eine Effizienz von 6% (Chapin et al., 1954). Dank intensiver Forschung können heute Elemente mit ähnlichem Aufbau produziert werden, die Effizienzen von bis zu 24% aufweisen (Zhao et al., 1998; Green et al., 2009). Dennoch haben diese Solarzellen deutliche Nachteile. Der wichtigste besteht in den hohen Produktionskosten, die vor allem für die Gewinnung von hochreinem Silizium aufgebracht werden müssen und somit ökonomische Probleme bedeuten (Goncalves et al., 2008).

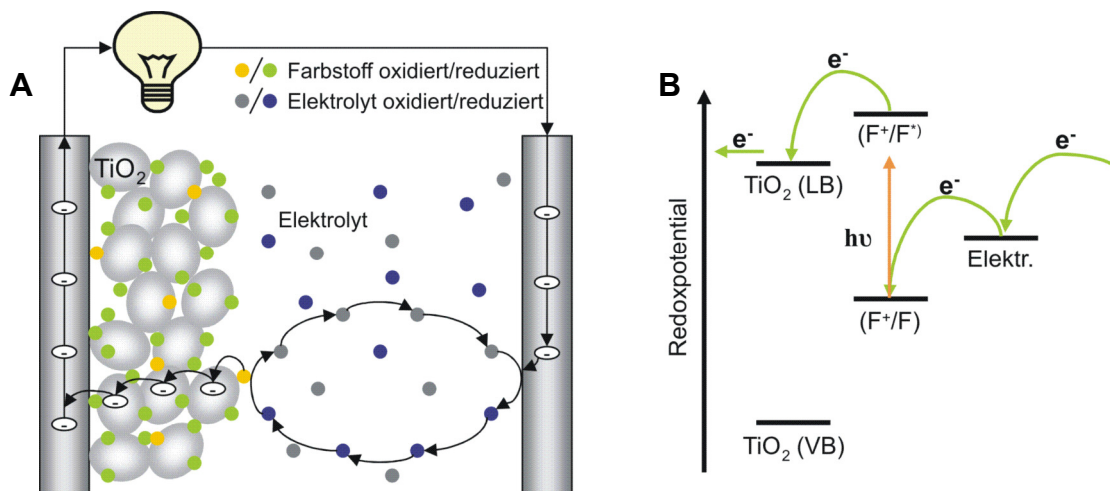


Abb. 1.1.1 Schema einer „Dye-sensitized solar cell“.

A) Schematischer Aufbau der Solarzellen nach O'Regan & Grätzel, 1991, B) relative Redoxpotentiale der beteiligten Komponenten, LB/VB – Leitungs- bzw. Valenzband, F^0/F^+ – Farbstoff angeregt/geladen, Elektr. – Elektrolyt.

Eine Alternative stellt die von O'Regan und Grätzel 1991 vorgestellte „Dye-sensitized solar cell“ (DSSC) dar (O'Regan & Grätzel, 1991). Sie besteht aus Farbstoffmolekülen, die an eine mesoporöse Titandioxid (TiO_2)-Schicht angelagert sind (Abb. 1.1.1). Die Farbstoffe

absorbieren Licht und geben im angeregten Zustand Elektronen an das TiO_2 ab, welches diese schnell zur Anode weiterleitet. Der Stromfluss wird geschlossen, in dem sich in der Zelle ein redoxaktives Elektrolyt befindet, welches die an den Farbstoffen entstandene Elektronenlücke wieder auffüllt und selber durch Elektronen an der Kathode regeneriert wird.

Die DSSCs besitzen somit zwei Vorteile gegenüber herkömmlichen Solarzellen. In ihnen wird zum einen TiO_2 verwendet, dessen Gewinnung deutlich billiger ist als bei Siliziummaterialien. Zum anderen wird in diesen Zellen das Prinzip der schnellen Ladungstrennung aus der Photosynthese genutzt. Diese minimiert die Rekombination der Ladungen, welche in Solarzellen auf Silizium-Basis häufig vorkommt und die maximal möglichen Effizienzen verringert. Dennoch wurden bis heute in DSSCs nur Effizienzen bis 11,4% erreicht (Cao et al., 2009). Um im Vergleich zu herkömmlichen Solarzellen konkurrenzfähiger zu werden, wird daher an allen Komponenten der DSSCs intensiv geforscht. Häufig werden statt flüssiger Elektrolyte feste Lochleitermaterialien verwendet (Goncalves et al., 2008). Diese fördern vor allem die Lebensdauer der DSSCs, da entsprechende Elemente nicht austrocknen können. Ebenso wird an alternativen Halbleiterstrukturen gearbeitet, die eine effizientere Elektronenweiterleitung zwischen Farbstoffen und Elektrode bewirken, optimale Interaktionen mit dem Elektrolyten zulassen und womöglich noch lichtstreuende Wirkung haben (Zhang et al., 2009; Sun et al., 2009). Letztere führt auch zu den Verbesserungen, die im Bereich der Farbstoffe angestrebt werden. Hier ist es natürlich ebenso wie in der Photosynthese erforderlich, dass Licht optimal und über den gesamten Bereich des sichtbaren Spektrums genutzt werden kann. So werden immer neue Farbstoffe synthetisiert und untersucht (Ooyama & Harima, 2009), aber auch sogenannte „Quantum dots“ werden als Elektroneninjektoren verwendet (Mora-Sero et al., 2009; s. I3.2). Zusätzlich wird in neueren Studien oftmals das Prinzip der pflanzlichen Antennensysteme auf DSSCs übertragen und somit eine Trennung zwischen lichtabsorbierenden und elektroneninjezierenden Farbstoffen vollzogen (Odobel & Zabri, 2005; Lee et al., 2007; Siegers et al., 2008). Im Zuge dieser Überlegungen ist die Idee, Komplexe zu verwenden, die während der Evolution auf eben diese Aufgaben optimiert wurden, nicht fern. Dementsprechend gibt es einige Beispiele in denen biologische Pigment-Protein-Komplexe in photovoltaischen Elementen Anwendung finden sollen (Das et al., 2004; Suemori et al., 2006). Auch die vorliegende Arbeit folgt dieser Idee, wobei der Lichtsammelkomplex II in technologische Elemente integriert werden soll.

2 Der Lichtsammelkomplex II

Als Antennenkomplex besitzt der Lichtsammelkomplex II höherer Pflanzen ("light harvesting complex II", LHCII) optimale lichtsammelnde und energieweiterleitende Eigenschaften, wodurch er sich als biologische Komponente in photovoltaischen Anwendungen anbietet. Seine Fähigkeit sich unter Zugabe von Pigmenten und Detergentien *in vitro* zu falten, eröffnet zusätzlich die Möglichkeit einer rekombinanten Expression. Dadurch sind Veränderungen in der Proteinsequenz, die neue Eigenschaften für den LHCII mit sich bringen, leicht zu gewährleisten. Um ihn jedoch erfolgreich nutzen zu können, muss man auch seine biologischen Eigenschaften kennen. Daher soll der LHCII *in vivo* und *in vitro* vorgestellt werden.

2.1 Der LHCII *in vivo*

Der LHCII ist der Hauptbestandteil des Antennensystems des PSII und wie alle an der Photosynthese beteiligten Pigment-Protein-Komplexe befindet er sich *in vivo* in der Thylakoidmembran der Chloroplasten. Hier gehört er in der Regel zum Superkomplex des PSII, welcher sich aus dem Kernkomplex (Reaktionszentrum D1+D2, innere Antennensysteme Chlorophyllprotein (CP) 43 und CP47) und den äußeren Antennen zusammensetzt (LHCII und minore Antennen CP24, CP26, CP29; Abb. 1.2.1).

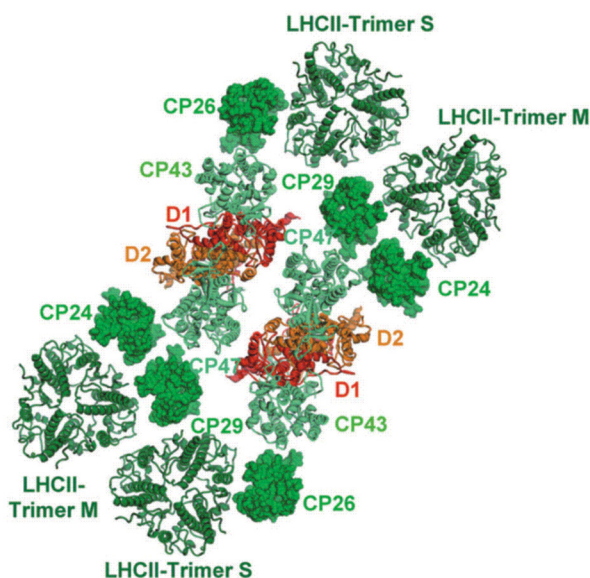
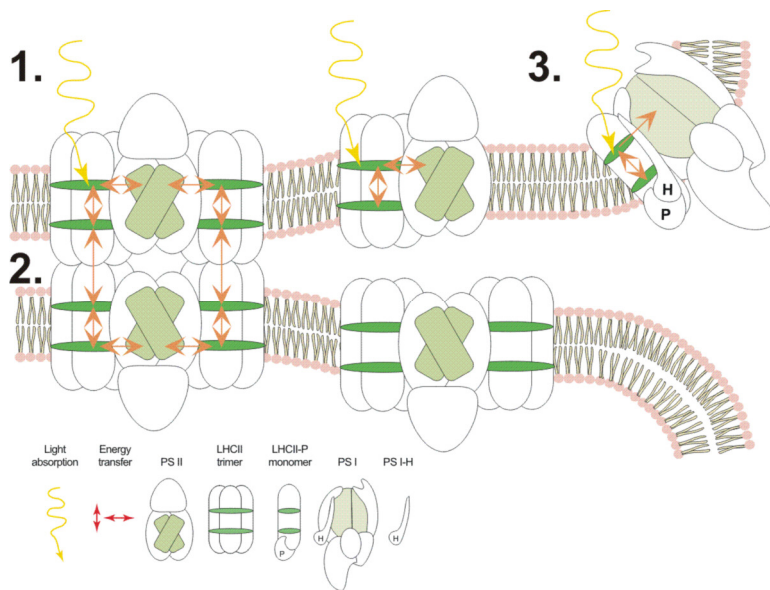


Abb. 1.2.1 Der PSII-Superkomplex.

Dargestellt ist die vermutliche Anordnung der Komplexe in höheren Pflanzen. Die Strukturdaten für die Reaktionszentren (D1 (rot) und D2 (orange)), und die inneren Antennen CP24 und CP26 entstammen aus Strukturanalysen in Cyanobakterien (PDB-Eintrag 2AXT). Die äußeren Antennen CP24, 26 und 29 sowie der LHCII (S – stark gebunden, M – moderat gebunden) wurden analog zu elektronenmikroskopischen Einzelpartikel-Analysen dem Kernkomplex angelagert (Dekker & Boekema, 2005). Strukturdaten für den LHCII wurden an Komplexen der Erbse ermittelt (PDB-Eintrag 2BHW). Abbildung entnommen aus Schmid, 2008.

Der LHCII bindet mit unterschiedlichen Affinitäten an verschiedenen Positionen des Superkomplexes (Boekema et al., 1999). Insgesamt konnten daher bis zu acht LHCII biochemisch im Superkomplexdimer nachgewiesen werden (Peter & Thornber, 1991). Damit stellt der LHCII das häufigste Protein in der Thylakoidmembran und somit auch eins der häufigsten Membranproteine überhaupt dar.

Neben der Hauptaufgabe als Lichtantenne für das PSII hat der LHCII weitere für die Pflanze sehr wichtige Funktionen. Diese spielen für die Nutzung des LHCII in technologischen Anwendungen nur eine untergeordnete Rolle, sie sollen hier aber der



Vollständigkeit halber nicht unerwähnt bleiben.

Abb. 1.2.2 Darstellung der verschiedenen Funktionen des LHCII.

Schematische Darstellung der Thylakoidmembran unter verschiedenen Lichtbedingungen und damit verbunden den unterschiedlichen Funktionen des LHCII. 1. Lichtsammelnde, 2. Strukturgebende, 3. Schutzfunktion. Abbildung verändert nach Allen & Forsberg, 2001.

Das PSII befindet sich mit seinen Antennenkomplexen in dem gestapelten Abschnitt der Thylakoide (Grana; Abb. 1.2.2). Hier interagieren vor allem LHCII-Trimere benachbarter Membranen. Sie sind damit maßgeblich an der Ausbildung dieser Thylakoidstrukturen beteiligt (Day et al., 1984, Standfuss et al., 2005), welche sowohl im Ablauf der Photosynthese als auch bei Schutzmechanismen gegen Lichtstress eine entscheidende Rolle spielen (Khatoon et al., 2009).

Zusätzlich kommen dem LHCII bei der nicht-photochemische Energielöschung („non-photochemical quenching“, NPQ) Aufgaben zu. Unter diesem Begriff werden alle Schutzfunktionen der Pflanze vor Lichtstress zusammengefasst. Man unterscheidet dabei mehrere Komponenten (Müller et al., 2001). Der LHCII ist hier für die „State Transition“ und das qE („energy dependant quenching“; schnellste Komponente des NPQ) entscheidend. Unter „State Transition“ wird die Fähigkeit des LHCII verstanden, sich in Abhängigkeit der Lichtverhältnisse und einer Phosphorylierung vom PSII abzulösen und zum PSI zu wandern, um dort als Antenne zu fungieren. Unter qE fällt dagegen die Fähigkeit des LHCII, bei Überbelichtung aufgenommene Energie schnell als Wärme abgeben zu können und auf diese Weise unschädlich zu machen. Beide Prozesse sind noch immer nicht komplett verstanden und werden intensiv beforscht (Reviews: Kargul & Barber, 2008; Horton et al., 2008; Dietzel et al., 2008).

2.2 Struktur des LHCII

Der LHCII ist ein kernkodiertes, trimeres Protein, welches aus drei Isoformen (Lhcb1-3) aufgebaut ist. Diese können sowohl Hetero- als auch, mit Ausnahme von Lhcb3, Homotrimere bilden (Jackowski et al., 2001; Standfuss & Kühlbrandt, 2004). Obwohl der LHCII ein Membranprotein ist, konnte seine Struktur durch mehrere Strukturanalysen zu 96% bis zu einer Auflösung von 2,5 Å aufgeklärt werden (Kühlbrandt et al., 1994; Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005). Nur die Lage der neun N-terminalen Aminosäuren ist bisher unbekannt. Dies liegt womöglich an den verschiedenen Isoformen, die sich vor allem in diesem Bereich unterscheiden, kann aber auch in einer Strukturflexibilität begründet sein (Jeschke et al., 2005).

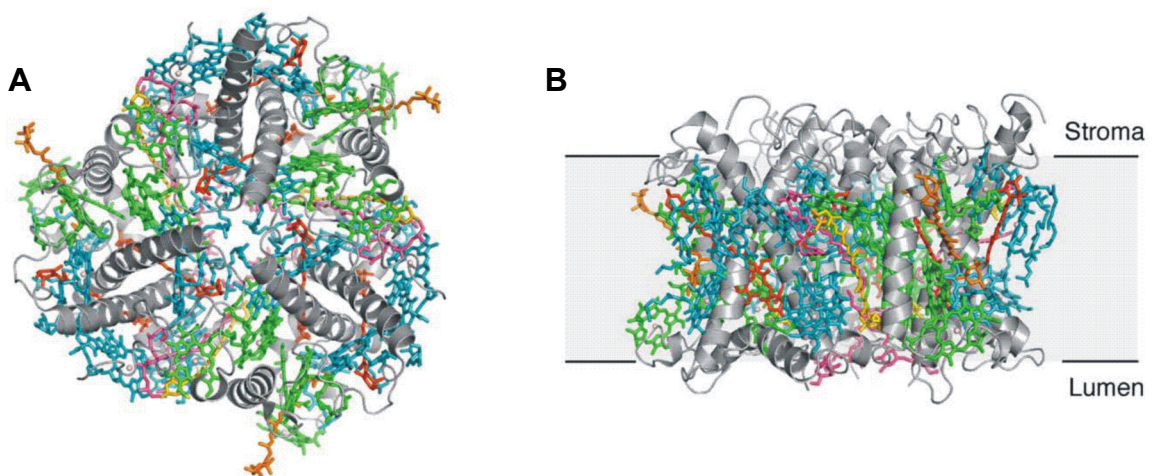


Abb. 1.2.3 Struktur des LHCII.

A) Stromale Aufsicht auf ein LHCII-Trimer, B) Ansicht mit Blick in die Thylakoidmembran. Grau – Proteinrückgrat, blau – Chl *a*, grün – Chl *b*, rot – Lutein, orange – Neoxanthin, gelb – Zeaxanthin, pink – Lipide. Abbildungen verändert nach Barros & Kühlbrandt, 2009.

Der LHCII bildet als Pigment-Protein-Komplex eine kompakte Struktur, in der das Protein als Gerüst für die nicht kovalent gebundenen Proteine dient (Standfuss et al., 2005; Abb. 1.2.3). Das Proteinrückgrat bildet drei transmembrane und zwei amphipathische Helices, die entsprechend ihrer Lage vom N-Terminus ausgehend durchnummeriert werden. Die beiden transmembranen Helices 1 und 4 bilden eine Superhelix, die dritte transmembrane Helix (3) liegt indes einzeln vor. Der N-Terminus des LHCII befindet sich im Stroma, der C-Terminus dagegen auf der lumenalen Seite. Auch die amphipathischen Helices lagern sich auf dieser Seite an die Membran an.

Insgesamt bindet ein LHCII-Monomer acht Chl *a*, sechs Chl *b*, zwei Luteine, ein Neoxanthin und ein Violaxanthin. Dabei wird im Trimer eine lokale Chlorophyllkonzentration von 0,3 M erreicht (Standfuss et al., 2005), die in Lösung ohne Aggregation nicht möglich wäre. Die Chlorophylle interagieren über ihr zentrales Magnesiumion mit freien

Elektronenpaaren von Stickstoff- oder Carbonylsauerstoffatomen. Diese befinden sich entweder in Aminosäureresten, im Proteinerückgrat, an gebundenen Wasserstoffmolekülen oder aber am Phosphatidylglykosid (PG). Die Chl *a* lagern sich auf diese Weise um die Superhelix von Helix 1 und 4, die Chl *b*, mit Ausnahme von Chl9, um Helix 3. Die Bindung der Carotinoide wird dagegen über Wasserstoffbrückenbindungen gewährleistet. Dabei legen sich die beiden Luteine um die Superhelix, das Neoxanthin ragt in der Nähe von Helix 3 in die Peripherie und Violaxanthin befindet sich an den Grenzflächen zwischen den Monomeren. Wie schon angedeutet, befinden sich zusätzlich noch Lipide im Komplex, von denen ein PG entscheidend für die Trimerisierung des Komplexes ist (Nußberger et al., 1993). Dabei wird es im Zwischenraum zweier Monomere gebunden und hält diese als „molekularer Kleber“ zusammen (Standfuss et al., 2005).

2.3 Der LHCII *in vitro*

Für die Untersuchung des LHCII bedarf es nicht unbedingt der Isolation des Komplexes aus der Pflanze, vielmehr ist es auch möglich mit dem rekombinanten Protein zu arbeiten. Dies ist zum einen der Isolation des Gens und zum anderen der Möglichkeit einer Faltung des Pigment-Protein-Komplexes *in vitro* zu verdanken. Die Isolation des Lhcb1 Gens aus der Erbse (*Pisum sativum*) gelang bereits 1984 (Cashmore, 1984) und die anschließende Klonierung des Gens in *Escherichia coli*-Bakterien ermöglichte eine gezielte Proteinexpression (Paulsen et al., 1990). Die Faltung des Apoproteins unter Zugabe von Pigmenten zu einem Komplex, der dem nativen sehr ähnlich ist, war erstmals 1987 erfolgreich (Plumley & Schmidt, 1987). Paulsen et al. (1993) etablierten nachfolgend eine Methode, in der das Apoprotein zuerst in Sodiumdodecylsulfat (SDS) denaturiert, dann durch Pigment- und Detergenzzugabe gefaltet, und abschließend störendes SDS durch KCl ausgefällt wird. Nach dieser als „Detergenz-Wechsel Methode“ bezeichneten Faltung erhält man jedoch nur LHCII-Monomere. Diese können aber anschließend durch Integration in Liposomen oder Durchführung einer Affinitätschromatographie trimerisiert werden (Hobe et al., 1994; Rogl et al., 1998).

So erhaltene LHCII-Trimere befinden sich im Gegensatz zu nativen Komplexen nicht in einer Membran. Daher müssen sie durch Detergentien in Lösung gehalten werden, die sich vermutlich in einer einlagigen Schicht um den LHCII anlagern (Abb. 1.2.4; Cardoso et al., 2009). Dies kann bei Untersuchungen bezüglich nativer Fragestellungen durchaus ein Problem darstellen. Für die in dieser Arbeit angestrebte Verwendung des LHCII in technischen Anwendungen gilt dies jedoch nicht. Vielmehr ergibt sich durch die Nutzung des rekombinanten Proteins die Möglichkeit, auf einfache Art und Weise Aminosäuren im Protein auszutauschen oder aber zusätzliche Peptide an den LHCII zu hängen. So steht aus

vorangegangenen Arbeiten eine Vielzahl möglicher LHCII-Varianten zur Verfügung. Unter anderem wurden zahlreiche singuläre Cysteine in den LHCII integriert und spezielle Peptidsequenzen angefügt (Volkov et al., 2009; Kosemund et al., 2000).

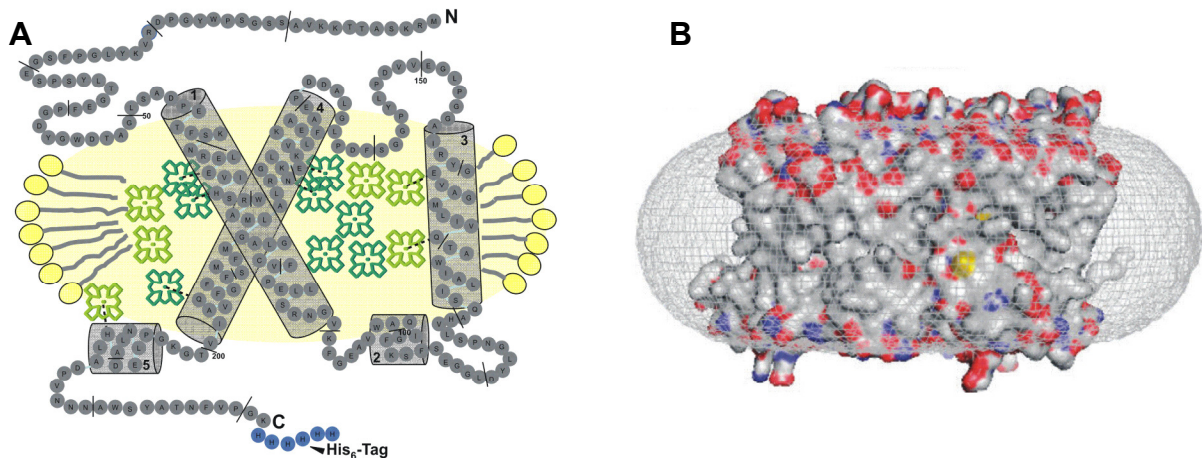


Abb. 1.2.4 Der LHCII *in vitro*.

Dargestellt sind monomere LHCII. A) Schematische Abbildung mit der Lage aller Aminosäuren, B) Darstellung des LHCII in einer Detergenzmizelle, Abbildung entnommen aus Cardoso et al., 2009.

Mit Hilfe solcher Modifikationen können weiterhin gezielte Interaktionen mit synthetischen Komponenten erreicht werden. So wurden bereits Cysteine für eine ortsspezifische Proteinmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen verwendet und dadurch ein biomimetischen Modell eines Photosystems hergestellt (Wolf-Klein et al., 2002). Ebenso kann ein C-terminal angefügter „His₆-Tag“ für Interaktionen zwischen dem LHCII und „Quantum dots“ genutzt werden (Erker et al., 2009, s. I3.2).

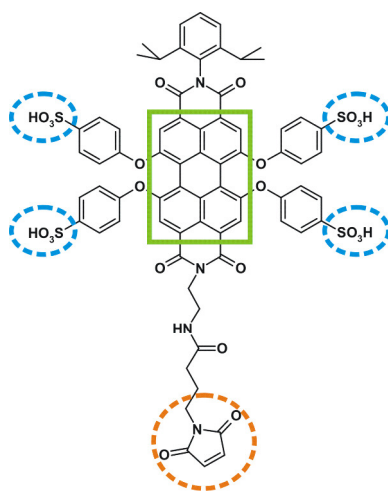
3 Synthetische Komponenten

Für eine mögliche technologische Nutzung des LHCII bedarf es einer Interaktion mit synthetischen Komponenten. Hier kommen sowohl organische als auch anorganische Materialien in Frage und im Folgenden sollen zum einen organische Fluoreszenzfarbstoffe zum anderen anorganische „Quantum dots“ vorgestellt werden.

3.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoffe sind organische Moleküle, die ein konjugiertes π -Elektronensystem besitzen. Dieses führt dazu, dass diese Moleküle durch Licht im sichtbaren Bereich angeregt werden können. Diese Energie wird in vielen Fällen nachfolgend unter anderem als Fluoreszenz wieder abgegeben (vgl. I4). Somit gehören auch die im LHCII gebundenen Chlorophylle zu diesen Stoffen, auch wenn sie biologischen Ursprungs sind. Neben ihren farbgebenden Eigenschaften werden Fluoreszenzfarbstoffe in der Biochemie oft als Marker

verwendet, die z.B. selektiv mit Zellstrukturen interagieren und diese in fluoreszenzmikroskopischen Methoden sichtbar machen (Lichtman & Concello, 2005). Neben ihren optischen Eigenschaften sind für Anwendungen in biologischen Systemen allerdings auch Stabilität und Wasserlöslichkeit der Farbstoffe wichtig. Eine Stoffklasse, die sich insofern für Anwendungen in diesem Bereich anbietet, sind Rylensfarbstoffe (Herrmann & Müllen, 2006). Sie zeichnen sich nicht nur durch eine hohe Stabilität aus, sondern können zusätzlich auch wasserlöslich gemacht werden (Margineanu et al., 2004). Die Stoffklasse der Rylene ist sehr variabel. Zum einen kann mit der Anzahl der Naphthaleneinheiten die zur Anregung nötige Energie und somit die Wellenlängen der optischen Eigenschaften beeinflusst werden. Je mehr Naphthaleneinheiten, desto größer ist das π -Elektronensystem und desto weniger Energie wird benötigt. Zum anderen ist es aber auch möglich, gezielt



gewünschte Löslichkeitseigenschaften oder aber aktive Gruppen für Interaktionen mit anderen Stoffen einzuführen. Die am Ende erhaltenen Farbstoffe bestehen dann oft nur noch zu einem geringen Teil aus der eigentlich entscheidenden Ryleneinheit (Abb. 1.3.1).

Abb. 1.3.1 Wasserlösliches Perylendiimid als Rylenebeispiel.

Dargestellt ist die Strukturformel eines Rylensfarbstoffs. Grün – eigentliche Perylenstruktur, blau – Wasserlöslichkeit vermittelnde Substituenten, orange – für Proteininteraktion funktionelle Gruppe, in diesem Fall Maleimid.

Für die Interaktionen zwischen Farbstoffen und Proteinen stehen in der Regel dieselben zahlreiche Strategien zur Verfügung, wie sie auch für eine Interaktion zwischen Polymeren und Proteinen verwendet werden (Gauthier & Klok, 2008). Entsprechend gibt es wasserlösliche Rylensfarbstoffe mit Maleimiden, N-Succinimidylestern und Nitrilotriessigsäure als aktive Gruppe (Peneva et al., 2008a; Peneva et al., 2008b). Trotz der zahlreichen Argumente für Rylensfarbstoffe lassen ihre geringen Extinktionskoeffizienten allerdings in einigen Experimenten den Einsatz anderer, kommerziell erhältlicher Fluoreszenzfarbstoffe sinnvoll erscheinen.

Der LHCII wurde bereits in mehreren Arbeiten kovalent mit Fluoreszenzfarbstoffen verbunden, wobei meistens Farbstoffmaleimide mit Cysteinen des Proteins interagierten. Dabei wurden neben der Herstellung eines biomimetischen Modells unter der Verwendung eines Rylensfarbstoffes (Wolf-Klein et al., 2002) unter anderem auch Fragen bezüglich der Faltung bzw. der Struktur des LHCII mit Hilfe von kommerziellen Farbstoffen bearbeitet (Horn et al., 2007; Huschenbett, 2001; Boggasch, 2006).

3.2 „Quantum dots“

Unter dem Begriff „Quantum dot“ (QD) werden annähernd kugelförmige Nanokristalle aus Halbleitermaterialien verstanden, welche im Gegensatz zu makroskopischen Festkörpern größenabhängige optische und elektronische Eigenschaften besitzen. Dieses liegt daran, dass ihr Radius geringer ist als der Bohr-Radius ihrer Exzitonen (Brus, 1991). Dadurch entstehen diskrete Energiezustände, wodurch sich QDs trotz ihres kristallinen Charakters wie Moleküle oder Atome verhalten. Für QDs aus Cadmiumselenid (CdSe) tritt dieser Effekt ein, sobald ihr Radius kleiner ist als 10 nm (Chan et al., 2002). Die bindenden Orbitale, die im Grundzustand die Elektronen enthalten, bilden das sogenannte Valenzband, die antibindende Orbitale das Leitungsband. Der Unterschied im Energieniveau dieser beiden heißt Bandlücke und bestimmt den Energiebetrag, der für eine Anregung der QDs erforderlich ist. Je kleiner die Partikel sind, desto größer wird diese Bandlücke und somit die zur Anregung nötige Energie. Folglich werden größere QDs schon mit langwelligerem Licht angeregt (Smith & Nie, 2010).

Atome, die sich auf der QD-Oberfläche befinden, liegen am Rande des Kristallgitters und sind somit nicht komplett gebunden. Dadurch können sie unter anderem leicht oxidiert werden, und für ein gleichbleibendes Verhalten der QDs bedarf es einer schützenden Schale (Hines & Guyot-Sionnest, 1996). Für CdSe-QDs bietet sich Zinksulfid (ZnS) als Material dieser Schale an. Dieses besitzt zum einen eine größere Bandlücke als CdSe und wirkt somit isolierend, zum anderen ähneln sich die Bindungslängen von ZnS und CdSe, wodurch die Anlagerung von ZnS an CdSe-Kerne erleichtert wird (Chan et al., 2002). Dennoch kommt es hierbei zu Fehlern im Kristallgitter, die unter anderem zu einer breiteren Verteilung der Größe bei der QD-Herstellung führen (Dabbousi et al., 1997). Ein Weg dieses zu vermeiden, ist die Verwendung eines Materialgradienten in der Schale. So entstehen bei einem CdS-ZnS Gradienten um einen CdSe-Kern sehr einheitliche und stabile QDs (Multishell-QDs; Xie et al., 2005a).

Die bisher vorgestellten QDs gehören alle zu dem sogenannten Typ I, bei dem die Schale isolierend wirkt und somit angeregte Elektronen nur im Kern lokalisiert sind. 2003 wurden erstmals QDs hergestellt, bei denen sich die Leitungs- und Valenzbänder von Kern und Schale überlappen (Kim et al., 2003). In diesen, als Typ II benannten, QDs kann somit ein Transfer von angeregten Elektronen aus dem Kern in die Schale stattfinden und es dadurch zu einer Ladungstrennung kommen (Abb. 1.3.2). Allerdings besitzen Typ II-QDs oft nur geringe absorbierende Eigenschaften (Xie et al., 2005b).

Beide QD-Typen haben gemeinsam, dass sie leicht aggregieren und in wässriger Umgebung nicht löslich sind. Diese Aggregation wird durch Moleküle, die auf der QD-Oberfläche binden und durch hydrophile Gruppen eine Wasserlöslichkeit produzieren, verhindert (Sperling & Parak, 2010). Für eine Bindung dieser Liganden auf der Oberfläche können unter anderem Thiole sorgen. Die Hydrophilie wird beispielsweise durch Carbonsäuren oder Aminogruppen der Liganden gewährleistet. Dieses Prinzip wurde erstmals 1998 von Chan und Nie verwendet. Sie benutzten Mercaptoessigsäure als Ligand und erhielten auf diese Weise wasserlösliche QDs (Chan & Nie, 1998).

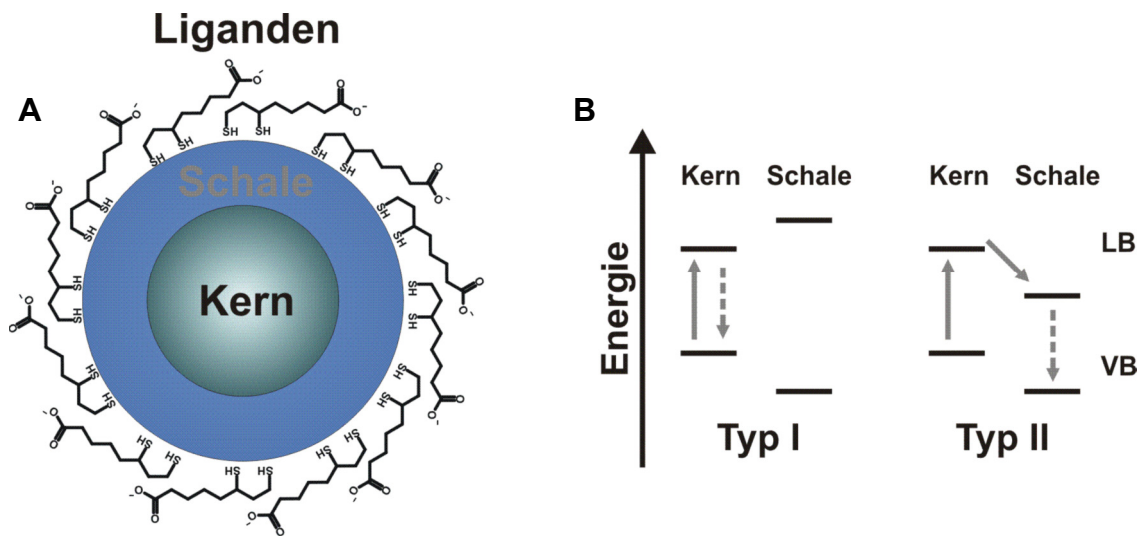


Abb. 1.3.2 Aufbau von „Quantum dots“.

A) Schematischer Aufbau eines QDs. Kern und Schale bestehen aus unterschiedlichen Halbleitermaterialien. Die Liganden, hier Dihydroliponsäure, vermitteln die Wasserlöslichkeit. B) Relative Energieniveaus der Valenz- (VB) und Leitungsbänder (LB) von Kern und Schale in Typ I und Typ II-QDs.

Aufgrund ihrer hohen Stabilität, ihrer breiten Absorptions- und engen Emissionsspektren, sowie der Möglichkeit gewünschte optische Eigenschaften durch die QD-Größe gezielt einstellen zu können, finden QDs in vielen bioanalytischen Forschungsbereichen Anwendung (Gill et al., 2008). Auch in DSSCs werden vermehrt QDs als farbstoffersetzende Materialien verwendet (Mora-Sero et al., 2009). In vielen bioanalytischen Verfahren bedarf es dabei einer Interaktion zwischen QDs und Proteinen. Diese kann sowohl über den Liganden, als auch über eine direkte Bindung der Proteine an die QD-Oberfläche erfolgen. Interaktionen zwischen Liganden und Proteinen sind oft elektrostatischer Natur (Mattousi et al., 2000; Shao et al., 2009), können aber auch durch chemische Reaktionen und Ausbildungen kovalenter Bindungen erzielt werden (Chan & Nie, 1998; Sperling & Parak, 2010). Im Gegensatz dazu geht die direkte Interaktion mit der QD-Oberfläche auf Peptide mit Metallaffinitäten zurück. Diese kann in Form eines Hexahistidylrestes („His₆-Tag“) durch eine Chelatbildung mit zweiwertigen Metallionen hervorgerufen werden und somit eher unspezifisch sein (Medintz et al., 2003). Es gibt aber auch Ansätze, in denen durch „Phage-

Display“-Analysen Peptide gefunden wurden, die z.B. nur spezifisch mit ZnS interagieren (Whaley et al., 2000; Flynn et al., 2003).

Bei einer Bindung des LHCII an QDs könnte dieser z.B. als Antenne für Typ II-QDs dienen. Erste Versuche mit Typ I-QDs bestätigen eine Interaktion beider Materialien (Erker et al., 2009). Abhängig vom LHCII-Klon und damit verbunden mit der Natur der Bindung, konnte zum einen eine Löschung der QD-Fluoreszenz und zum anderen eine Verminderung der QD-Laufweite in einer Gelelektrophorese beobachtet werden. Demnach kann die Interaktion entweder über die Metallaffinität des „His-Tags“ oder elektrostatisch mit der N-terminalen Domäne des LHCII erfolgen.

4 Energietransfer

Energietransfer spielt in vielen Systemen eine entscheidende Rolle. Hierzu zählen sowohl die Photosynthese als auch Solarzellen sowie alle Systeme, die mindestens zwei Stoffe enthalten, die Lichtenergie absorbieren können. Dementsprechend wurde dieses Thema vorangegangen immer wieder angeschnitten und soll nun genauer betrachtet werden.

Die Absorption von Licht bewirkt in einem Molekül, dass eines seiner Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben wird. Dadurch befindet sich das gesamte Molekül im sogenannten angeregten Zustand. Dieser ist jedoch zeitlich begrenzt und durch die Abgabe der aufgenommenen Energie fällt das Elektron wieder auf sein ursprüngliches Energieniveau zurück. Nun gibt es allerdings verschiedene Möglichkeiten der Energieabgabe. Zu den am häufigsten vorkommenden gehören die Abgabe als Wärme durch Schwingungen des Moleküls, die Abgabe als Licht in Form von Fluoreszenz oder aber die Weiterleitung der Energie auf ein anderes Molekül (Heldt, 2003). Dabei wird immer der für den Augenblick schnellste wahrgenommen und dementsprechend ist die Energieabgabe bei jedem Molekül und in Abhängigkeit der Umgebung unterschiedlich. Die Fluoreszenzquantenausbeute eines Stoffes gibt beispielsweise an, welcher Prozentsatz der aufgenommenen Photonen als Fluoreszenz abgegeben wird, wobei sich die Werte je nach verwendetem Lösungsmittel deutlich unterscheiden können.

Sobald sich zwei Moleküle räumlich nahe kommen, kann die Energie zwischen diesen übertragen werden. Ist der Abstand sehr gering, überlappen sich die Orbitale der Moleküle. Dabei kommt es zuerst zu einer Delokalisierung des angeregten Elektrons und schließlich zum Austausch des angeregten Elektrons gegen ein Elektron im Grundzustand. Dieser von Dexter (1953) beschriebene Mechanismus findet allerdings recht selten statt, da sogar im LHCII die meisten Pigmente hierfür zu weit voneinander entfernt vorliegen (van Amerongen & van Grondelle, 2001). Viel häufiger wird dagegen ein Energietransfer nach dem von Förster (Förster, 1946) vorgeschlagenen Prinzip beobachtet. Dieser ist strahlungsfrei und

wird daher auch als Fluoreszenz- (oder Förster-) Resonanzenergietransfer (FRET) bezeichnet. Prinzipiell kann man sich hierfür vorstellen, dass das angeregte Molekül (Donor) aufgrund der Energie oszilliert und sich diese Schwingung auf das zweite Molekül (Akzeptor) überträgt, bis die gesamte Energie übertragen wurde und der Donor im Grundzustand nicht mehr schwingt.

Für einen effizienten FRET bedarf es einiger Voraussetzungen. Hierbei spielt der Abstand beider Stoffe eine entscheidende Rolle, da dieser in der sechsten Potenz die Effizienz beeinflusst. Dementsprechend kann ein Energietransfer nach dem FRET-Prinzip nur bis zu einem Abstand von ungefähr 10 nm erfolgen. Des Weiteren müssen das Fluoreszenzspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen und die Orientierung der Übergangsdipolmomente beider Stoffe einen Energietransfer zulassen (Abb. 1.4.1, Miller, 2005). Dieses ist nicht möglich, sobald diese senkrecht zueinander stehen. Hier zeigt sich wieder die optimale Anpassung des LHCII an seine physiologische Aufgabe der Lichtsammlung. Durch die zahlreichen auf den ersten Blick chaotisch angeordneten Pigmente wird in einem Trimer so gut wie jede Orientierung der Dipolmomente erreicht, wodurch Lichtquanten egal aus welcher Richtung absorbiert werden

können (Barros & Kühlbrandt, 2009). In Hybridkomplexen kann dadurch auch nahezu unabhängig von der Lage des zweiten Moleküls ein Energietransfer stattfinden.

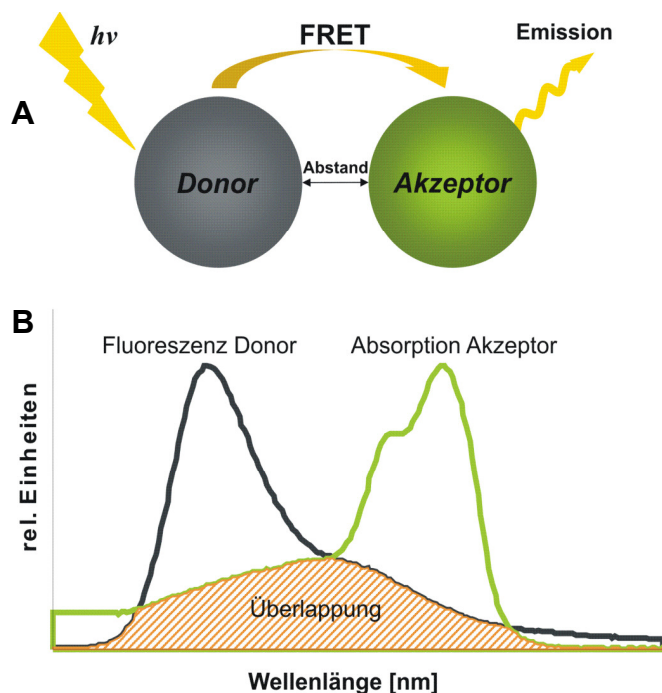


Abb. 1.4.1 Schematische FRET-Darstellung

A) Nach der Anregung des Donors wird aufgenommene Energie übertragen und schließlich vom Akzeptor emittiert. Die Effizienz des Transfers hängt unter anderem vom Abstand beider Moleküle ab. B) Darstellung der Überlappung von Donorfluoreszenz und Akzeptorabsorption am Beispiel Rhodamin (Donor) und LHCII (Akzeptor).

In der Bioanalytik wird FRET aufgrund der starken Abhängigkeit vom Abstand als Methode verwendet, um Interaktionen zweier Stoffe zu untersuchen (Sapsford et al., 2006). Dabei dient der sogenannte Försterradius (R_0) oftmals als Auswahlkriterium für die verwendeten Fluorophore. Er entspricht nämlich dem Abstand, bei dem der Energietransfer zwischen zwei Stoffen 50% beträgt. Trotz der Schwierigkeit in einem QD ein Dipolmoment zu bestimmen, lassen Untersuchungen des Energietransfers darauf schließen, dass auch hier

das FRET-Prinzip zu Grunde liegt und somit angewendet werden kann (Pons et al., 2007). Daher finden auch QDs auf diesem Gebiet immer mehr Gebrauch.

In der Analyse von FRET-Ereignissen wird häufig die Fluoreszenzspektroskopie verwendet. Anzeichen für einen Energietransfer lassen sich dabei leicht erkennen. So führt er auf Seiten des Donors zu Fluoreszenzintensitäten, die geringer sind als bei Abwesenheit des Akzeptors (= Löschung der Donorfluoreszenz), auf Seiten des Akzeptors zu Intensitäten die stärker sind als in Abwesenheit des Donors (= Sensibilisierte Akzeptorfluoreszenz). Ein Beispiel für dieses Phänomen ist der Energietransfer innerhalb des LHCII. Hier können sowohl Carotinoide als auch Chl *b* oder Chl *a* angeregt werden. Anschließend übertragen beide ihre Energie auf Chl *a* (Gradinaru et al., 2000; Croce et al., 2001; Kleima et al., 1997). Dieses führt dazu, dass in einem intakten LHCII nur der Endakzeptors (Chl *a*) bei 680 nm fluoresziert. Die Fluoreszenz der jeweiligen Donoren ist dagegen vollständig gelöscht.

5 Zielsetzung der Arbeit

Die hier vorliegende Arbeit wurde im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus Müllen am Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Basché am Institut für physikalische Chemie der Universität Mainz erstellt. Das Ziel dieser Kooperation ist die Herstellung und Charakterisierung von Hybridkomplexen aus biologischen, organischen und anorganischen Komponenten, die zur Lichtsammlung und Ladungstrennung fähig sind. Der LHCII stellt hierbei die biologische, Rylene Farbstoffe die organische und QDs die anorganische Komponente dar. Die erhaltenen Hybridkomplexe sollen dabei Erkenntnisse für vergleichbare, photovoltaisch nutzbare Anwendungen liefern.

Als erster Schritt in der Herstellung von Hybridkomplexen aus allen drei Materialien sollten in dieser Arbeit Interaktionen des LHCII entweder mit Fluoreszenzfarbstoffen oder QDs untersucht werden. In Bezug auf Hybridkomplexe aus Farbstoffen und LHCII ergaben sich vier Fragestellungen. Hierbei ist zunächst die Füllung der Absorptionsgrünlücke des LHCII zu nennen. Trotz ihres physiologischen Nutzens in der Pflanze stellt die Grünlücke für technologische Anwendungen des isoliert vorliegenden LHCII einen Nachteil dar. Es wäre hierbei vorteilhafter, einen LHCII zu verwenden, der in der Lage ist, das gesamte sichtbare Licht zu absorbieren, und somit verwendbar zu machen. Aus diesem Grund sollten Fluoreszenzfarbstoffe, die zwischen 500 und 600 nm absorbieren und somit als Donor für den LHCII dienen, kovalent an den Pigment-Protein-Komplex gebunden und auf diese Weise die Grünlücke gefüllt werden.

Die zweite Fragestellung folgt direkt aus der ersten. Es ist denkbar, dass ein einziger Farbstoff nicht ausreichen wird, die Grünlücke effektiv zu füllen. Daher sollten bis zu vier

Farbstoffe kovalent an den LHCII gebunden werden. Hierbei stand neben der Grünlückenfüllung auch die Frage im Vordergrund, wie viele Moleküle kovalent an das Protein gebunden werden können, bevor die Struktur des Pigment-Protein-Komplexes nachhaltig gestört wird.

In vivo dient der LHCII nur als Lichtantenne und ist nicht in der Lage selber Elektronen abzugeben und für eine Ladungstrennung zu sorgen. Letztere ist aber ein entscheidender Schritt in der Nutzung der aufgenommenen Sonnenenergie. Daher sollten Hybridkomplexe aus LHCII und unterschiedlichen Farbstoffen auf ihre Verwendbarkeit untersucht werden. Die dabei verwendeten Farbstoffe sollten Energieakzeptoren in Bezug auf den LHCII sein und zusätzlich als Elektroneninjektoren fungieren können.

Schließlich sollten neben der in vorherigen Arbeiten häufig verwendeten Reaktion zwischen Farbstoff-Maleimiden und Cysteinen des Proteins auch weitere Farbstoff-Protein-Interaktionen am LHCII untersucht werden, um somit das Repertoire an möglichen Reaktionen für zukünftige Hybridkomplexe zu vergrößern.

Für die Untersuchung von Hybridkomplexen aus QDs und LHCII ergaben sich dagegen eher grundlegende Fragestellungen. Hier sollte zunächst das Verhalten der verwendeten QDs in wässriger Lösung untersucht werden, um anschließend stabile Bedingungen bei den Versuchen mit Hybridkomplexen zu gewährleisten. Im Gegensatz zu Farbstoff-LHCII-Interaktionen ist die Bindung zwischen QDs und LHCII bisher nicht eindeutig nachgewiesen worden. Daher sollte diese zum einen bestätigt werden, zum anderen sollte untersucht werden, ob sie durch die Verwendung von Peptiden mit spezifischen Affinitätssequenzen verbessert werden kann.

Eine zentrale Frage bei allen zu untersuchenden Hybridkomplexen bezog sich auf einen möglichen Energietransfer zwischen den verschiedenen Komponenten. Hier sollte nicht nur festgestellt werden, ob ein Energietransfer prinzipiell möglich ist, vielmehr ist das entscheidende Kriterium für eine spätere Nutzung der Komplexe die Effizienz des Transfers.

II Material und Methoden

1 Geräte

Analytische HPLC: System von Jasco Labor- u. Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt

<i>Entgaser</i>	GASTORR 154
<i>Gradientenmischer</i>	LG-1580-04 Quaternary Gradient Unit
<i>Pumpe</i>	PU-1580 Intelligent Pump
<i>Detektor</i>	Diode Array Detector MD-1515
<i>Säule</i>	Chromolith Speed-Rod, RP 18E, Nr. 1.51450.0001, 4,6x50 mm Merck, Darmstadt
<i>Software</i>	Borwin-PDA, Version 1.50

Autoklav:

Varioklav Typ 500 Dampfsterilisator, H+P Labortechnik GmbH, München

CD-Spektrometer:

<i>Spektrometer</i>	Jasco J-810, Jasco Labor- u. Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
<i>Kühlung</i>	F200, Julabo, Seelbach
<i>Software</i>	Spectra Manager, Version 1.50

Digitalkamera

Canon Powershot A710IS, Canon Deutschland GmbH, Krefeld

Drehrad

Kulturenrad Typ Rotator, Bachofer GmbH, Reutlingen

Fluoreszenz-Spektrometer

<i>Spektrometer</i>	Fluoromax-2 ISA SPEX, Jobin Yvon, Grasbrunn
<i>Kühlung</i>	Ministat Compatible Control, Huber Kältemaschinenbau, Offenbach
<i>Software</i>	Datamax Software Version 2.24

FPLC: System von Pharmacia LKB, Bromma, Schweden

<i>Pumpe</i>	High Precision Pump P-500
<i>Gradientenmischer</i>	Gradient Programmer GP-250 PLUS
<i>Fraktionssammler</i>	Fraction Collector FRAC-100
<i>Detektor</i>	Monitor UV-M II (mit 280 + 436 nm Filter)
<i>Schreiber</i>	Recorder REC 102
<i>Säulen</i>	1) Mono Q HR5/5 Column, 5x50 mm, 1 ml, Pharmacia LKB, Bromma, Schweden
	2) Poros HQ 10 µm Column, 4,6x100 mm, 1,7 ml, Applied Biosystems, Foster City, USA

French Press:

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

Magnetrührer

Ikamag RCT, IKA-Labortechnik, Staufen

Mixer:

Heavy Duty Blender, Blender Waring, New Hartford, USA

PCR-Gerät:

Primus 25 Legal PCR System, Modell 5524, MWG-Biotech, Ewersberg
Whatman Biometra T Gradient, Biometra, Göttingen

Präparative Gelelektrophorese: System von BioRad, München

<i>Gelkammer</i>	Mini Prep Cell
<i>Gelzylinder</i>	13 cm Höhe, 7 mm Innendurchmesser
<i>Spannungsgerät</i>	Power PAC 3000
<i>Pumpe</i>	Econo Pump, Model EP-1
<i>Fraktionssammler</i>	Fraction Collector, Model 2128

Gradienten-PCR:

T-Gradienten Thermoblock, Biometra GmbH, Göttingen

pH-Meter:

Inolab pH Level2, WTW GmbH, Weilheim

Photometer:

- 1) Jasco V-550 UV/Vis Spectrophotometer, Jasco Labor- u. Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
- 2) Eppendorf BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg

Protein-Gelelektrophorese (analytisch):

<i>Gel-Gießapparatur</i>	Midget-Systems, Pharmacia LKB, Bromma, Schweden
<i>Gel-Kammer</i>	Mighty Small II SE 250/SE260, Pharmacia LKB, Bromma, Schweden
<i>Spannungsquelle</i>	Elektrophoresis Power Supply EPS 301, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.
<i>Kühlung</i>	Haake GH, Haake D1, Haake Messtechnik GmbH, Karlsruhe
<i>Geltrockner</i>	2003 Slab Gel Dryer; LKB Produkter, Bromma, Schweden

Reinstwasseranlage

Optilab-Standard, MembraPure, Lörzweiler

Rotationsverdampfer:

<i>Rotationsverdampfer</i>	Heidolph VV 2000, Heidolph Elektro, Kelheim
<i>Vakuumpumpe</i>	CVC 2000, Vacuubrand GmbH&Co, Wertheim
<i>Kühlung</i>	Minichiller, Huber, Offenburg

Schüttler:

<i>für Bakterienkulturen</i>	Certomat H, B.Braun Biotech International, Melsungen
<i>für Gel</i>	Phero-Shaker, Biotec-Fischer, Reiskirchen

SpeedVac:

<i>SpeedVac</i>	Vacuum Concentrator Mini-30, Bachhofer GmbH, Reutlingen
<i>Vakuumpumpe</i>	RV5 Edwards, Bachhofer GmbH, Reutlingen
<i>Kühlfalle</i>	KF-2-60, Bachhofer GmbH, Reutlingen

Sterilbank:

Laminar Flow, SLEE Semiconductor Technik GmbH, Mainz

Transilluminator:

<i>System</i>	VersaDoc Imaging System, Modell 3000, BioRad, München
<i>Software</i>	Quantity One Version 4.3.0, BioRad, München

Ultraschallbad:

Sonorex Super RK102H, Bandelin, Berlin

UV-Lampe:

SFB 184, Bachhofer GmbH, Reutlingen

Vortexer:

- 1) Bachofer Vortex Genie2™, Bachhofer GmbH, Reutlingen
- 2) MS2 Minishaker, IKA Labortechnik, Staufen

Waagen: Sartorius, Göttingen

<i>Präzisionswaagen</i>	BP 2100 S; L 610
<i>Analysenwaage</i>	A 200 S

Wärmeschrank:

S12 Memmert, Memmert Schwalbach

Wasserkocher

HB4 basic, IKA Labortechnik, Staufen

Wasserbad:

Thermomix MM, B. Braun Biotech International, Melsungen

Zentrifugen:

<i>Tischzentrifugen</i>	Hettich EBA 12, Rotor 1124, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
<i>Kühlzentrifugen</i>	1) Beckmann Kühlzentrifuge J2HS (Rotoren: JLA-10500; JA20), Beckmann Instruments, München
	2) Hettich Mikro 22R (Rotoren 1015 und 1195), Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
<i>Ultrazentrifugen</i>	Beckmann Instruments, München
	1) Optima XL-100K, Optima XL-90K, Optima XL-80K (Rotor SW 60Ti)
	2) Airfuge (Rotor A110)

2 Chemikalien und Längenstandards

2.1 Verwendete Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Herstellern in p.A.-Qualität erworben:

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg; Avanti Polar-Lipids, Alabaster, USA; Biomol, Hamburg; BioRad, München; Boehringer, Mannheim; Fermentas, Sankt Leon-Rot; Macherey-Nagel, Düren; Merck KGaA, Darmstadt; New England Biolabs, Bad Schwalbach; Novagen, Darmstadt; Perkin&Elmer Life Science, Waltham, USA; Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen; Pierce, Rockford, USA; Roche Applied Science, Mannheim; Roth GmbH, Karlsruhe; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg; Sigma-Aldrich, Deisenhof; Stratagene, La Jolla, USA.

Zusätzlich wurden die organischen Lösungsmittel Ether und Aceton vor dem Gebrauch destilliert. Der Ether wurde auf diese Weise von Peroxiden befreit. Hierfür wurde er 2 h mit KOH-Plättchen unter Rückfluss gekocht und anschließend destilliert. Das Aceton wurde durch die Destillation vollständig von Wasser befreit. Außerdem konnte Acetonabfall nach zweimaliger Destillation in einigen Anwendungen wiederverwendet werden.

2.2 Verwendete Längenstandards

Bei den durchgeführten Gelelektrophoresen dienten Standards mit definierten und bekannten Größen als Kontrolle. Bei der Agarosegelelektrophorese (II5.9) wurde je nach den erwarteten DNA-Banden die 100 bp- oder 1 kb-DNA „Ladder“ eingesetzt (Abb. 2.2.1). Beide konnten direkt verwendet werden.

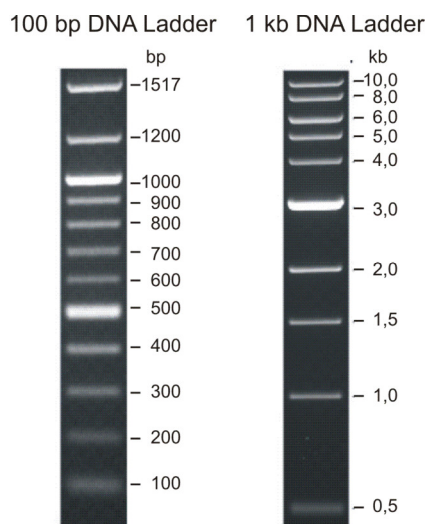
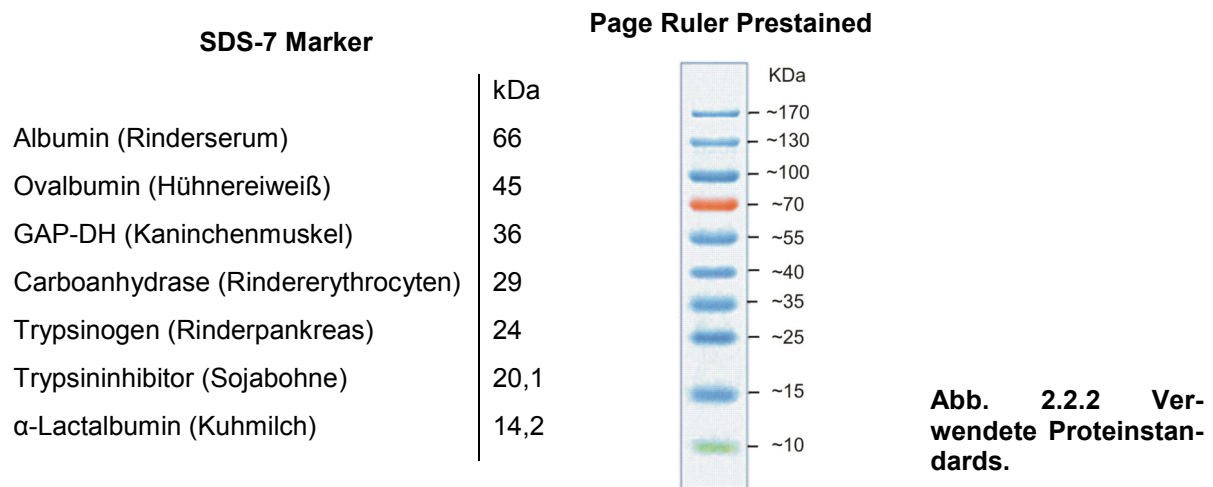


Abb. 2.2.1 Verwendete DNA-Längenstandards

Beide Längenstandards wurden von NEB, Bad Schwalbach bezogen.

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (II7.2) wurde als Proteinstandard in der Regel der „SDS-7 Marker“ von Sigma-Aldrich, Deisenhof verwendet (Abb. 2.2.2). Die darin enthaltenen Standardproteine mussten vor dem Gelauftrag durch 1 min Kochen bei 100°C denaturiert werden und wurden erst durch Coomassiefärbung sichtbar. In manchen Fällen wurde aber auch der „Page Ruler Prestained“ von Fermentas, Sankt Leon-Rot benutzt.

Dieser konnte direkt verwendet werden, außerdem waren die Proteine mit Farbstoffen markiert, so dass sie ohne Coomassiefärbung sichtbar waren. Allerdings waren die entsprechenden Größenangaben nur ungefähr.



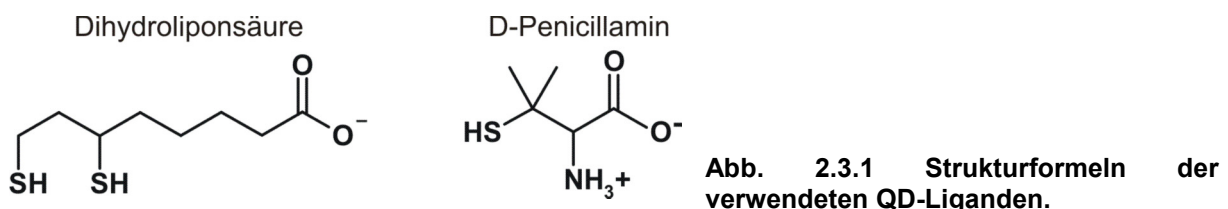
3 Verwendete synthetische Komponenten

Die verwendeten synthetischen Komponenten wurden zum Großteil von den Kooperationspartnern des Gesamtprojektes hergestellt. Die QDs („Quantum dots“) wurden dabei in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Basché am Institut für physikalische Chemie, Universität Mainz produziert. Es kamen zwei verschiedene Arten zum Einsatz, welche sich im Aufbau ihrer Hülle unterschieden (Tabelle II.1). Zusätzlich waren sie mit zwei verschiedenen Liganden besetzt, die sie in Wasser löslich machten (Abb. 2.3.1).

Tabelle II.1 Verwendete QDs

Name	Kern	Hülle	Durchmesser	Spektrale Eigenschaften
Multishell-QDs	CdSe	CdS-ZnS Gradient*	~ 7 nm	s. III.4.1
6xZnS-QDs	CdSe	6 Schichten ZnS	~ 6 nm	

* Vergleiche Xie et al., 2005a



Die verwendeten Farbstoffe wurden entweder in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus Müllen am Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz (MPI-P) hergestellt, oder aber von den Firmen Dyomics, Jena oder Invitrogen, Darmstadt bezogen (Tabelle II.2). Ihre Strukturformeln sind in Abb. 2.3.2 dargestellt.

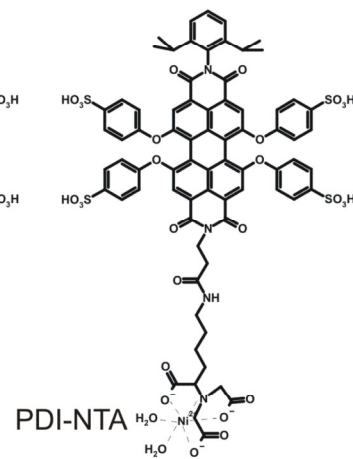
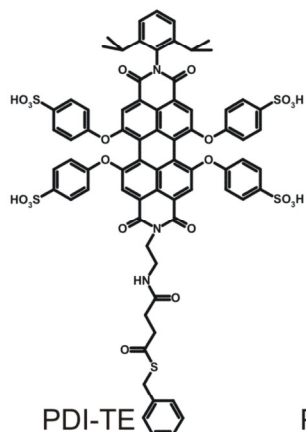
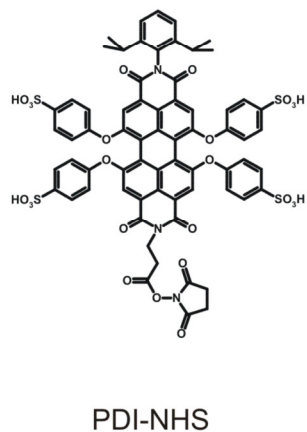
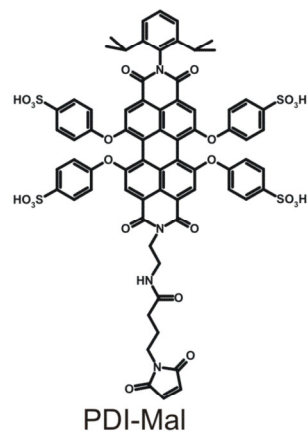
Tabelle II.2 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Abkürzung	Name	Funktionelle Gruppe	Molekulargewicht [g/mol]	Absorptionsmaximum (Lösungsmittel) [nm]	Fluoreszenzmaximum (Lösungsmittel) [nm]	$\epsilon_{\max}$ (Lösungsmittel) [cm ⁻¹ M ⁻¹]	Fluoreszenzquantenausbeute	Hersteller
Rylen-Farbstoffe								
PDI-Mal	Perylen-Diimid-Maleimid	Maleimid	1535,38	566 (H ₂ O)	620 (H ₂ O)	16.600 (H ₂ O)	0,4 (H ₂ O) ~1 (0,1% LM)*	MPI-P
PDI-NHS	Perylen-Diimid-N-Succinimidylester	N-Succinimidylester	1408,37	566 (H ₂ O)	620 (H ₂ O)	21.070 (H ₂ O)	0,58 (H ₂ O) 0,9 (0,1% LM)*	MPI-P
PDI-TE	Perylen-Diimid-Thioester	Thioester	1488,60	568 (H ₂ O)	622 (H ₂ O) 605 (0,1% LM)*	23.400 (H ₂ O)	0,54 (H ₂ O) 0,8 (0,1% LM)*	MPI-P
PDI-NTA	Perylen-Diimid-Nitrilotriaceticacid	Nitrilotriaceticacid	1555,54	562 (H ₂ O)	614 (H ₂ O)	35.000 (H ₂ O)	0,15 (H ₂ O)	MPI-P
TDI-Mal	Terrylen-Diimid-Maleimid	Maleimid	1599,64	638 (H ₂ O) 677 (0,1% LM)*	695 (0,1% LM)*	16.630 (H ₂ O)	0 (H ₂ O) 0,05 (0,1% LM)* 0,08 (DMSO)	MPI-P
TDI-nf	Terrylen-Diimid	keine	1523,63	685 (H ₂ O)	710 (MeOH)	17.875 (H ₂ O)	0,12 (0,1% LM)*	MPI-P
TMIMA	Terrylen-Monoimid-Monoanhydrid-Maleimid	Maleimid	1541,00	682 (Toluol) 672 (DMF)*	726 (Toluol) 707 (DMF)*	~40.000 (DMF)*	unbekannt	MPI-P
DNQDI	Dinaphthalen-Quaterrylen-Diimid-Maleimid	Maleimid	2001,10	710 (Toluol)	720 (Toluol)	143.000 (Toluol)	0,4 (Toluol)	MPI-P
Kommerzielle Farbstoffe								
Bodipy-IAA	Bodipy-507/545-Iodacetamid	Iodacetamid	431,03	508 (MeOH)	543 (MeOH)	69.000 (MeOH)	unbekannt	Invitrogen
Rho-Mal	Rhodamin Red C2-Maleimid	Maleimid	680,79	560 (MeOH)	580 (MeOH)	119.000 (MeOH)	0,5 (0,1% LM) ¹	Invitrogen
Rho-NHS	Rhodamin Red-X-N-Succinimidylester	N-Succinimidylester	768,90	560 (MeOH) 573 (0,1% LM)*	580 (MeOH) 590 (0,1% LM)*	129.000 (MeOH)	0,6 (0,1% LM)*	Invitrogen
DY-731	DY-731-Maleimid	Maleimid	885,05	736 (EtOH)	760 (EtOH)	240.000 (EtOH)	0,13 (0,1% LM) ² 0,16 (DMSO) ²	Dyomics

* im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Werte, ¹ im Rahmen der Diplomarbeit von Mara Werwie ermittelte Werte (Werwie, 2009), ² im Rahmen der Diplomarbeit von Sabine Wiegand ermittelte Werte (Wiegand, 2008).

Rylen-Farbstoffe

Perylene



“Akzeptor-Rylene”

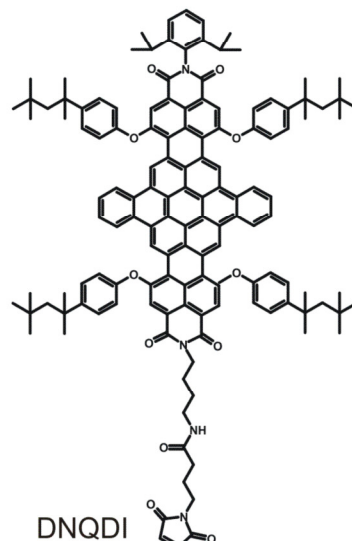
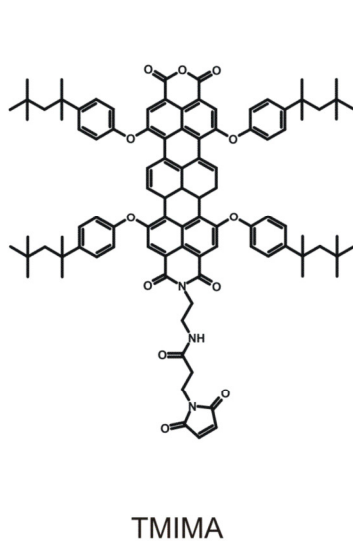
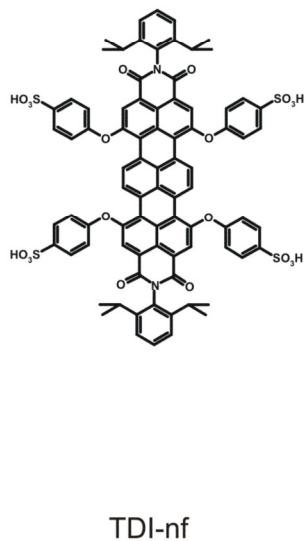
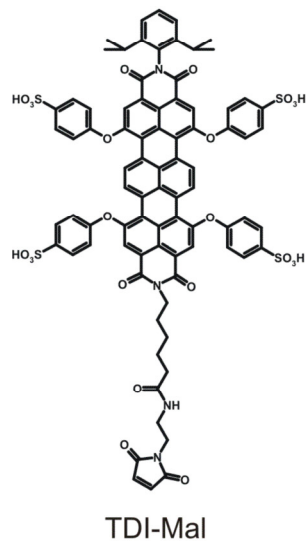
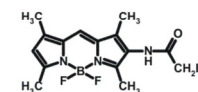
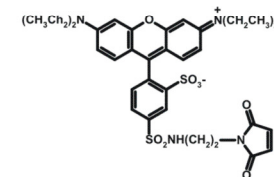


Abb. 2.3.2 Strukturformeln der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

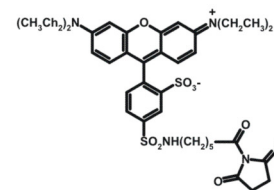
Kommerzielle Farbstoffe



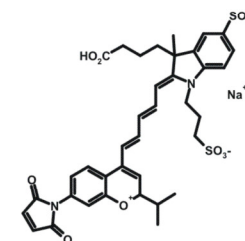
Bodipy-IAA



Rho-Mal



Rho-NHS



DY-731

4 Verwendete organische Materialien

Die verwendeten organischen Materialien lassen sich in Bakterien und Vektor, LHCII-Klone und sonstige organische Materialien trennen und werden daher gesondert beschrieben.

4.1 Verwendete Bakterienstämme und Vektor

Die Expression der rekombinanten Proteine erfolgte in verschiedenen *Escherichia coli* (*E.coli*)-Stämmen. In den meisten Fällen wurde der Stamm JM101 (NEB, Bad Schwalbach) verwendet. Auch die Expression von WSCP erfolgte in diesem Stamm. Im Zusammenhang mit der Herstellung des LHCII-Klons mit N-terminalem Cystein wurden aber auch die beiden Bakterienstämme BL21 (DE3) und BL21 (DE3) pLysS (beide Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. Die Genotypen der verwendeten Bakterienstämme lauteten wie folgt:

JM101:	<i>E. coli</i> supE, thi-1, $\Delta(\text{lac-proAB})[\text{F}'\text{traD36, proAB, lac}^q, \Delta\text{M15}]$
BL21 (DE3):	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> λ (DE3)
BL21 (DE3) pLysS:	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> λ (DE3) [pLysS Cam ^r]

Alle Expressionen erfolgten mit dem Expressionsvektor pDS12-RBSII (Abb. 2.4.1; Bujard et al., 1987), wodurch die transformierten Bakterien eine Ampicillin-Resistenz erhielten. Dabei war das Wunschen in der „Multiple Cloning Site“ des Vektors eingefügt worden und stand daher unter der Kontrolle des Lac-Operons.

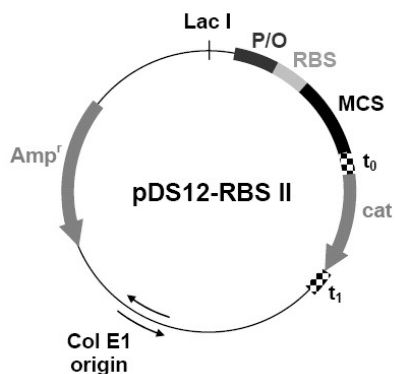


Abb. 2.4.1 Schematische Darstellung des Vektors pDS12-RBSII.

Die Bezeichnungen auf dem Vektor stehen für folgende Abschnitte: „Col E1 origin“ – Replikationsursprung, „Amp^r“ – β -Lactamase-Gen für Ampicillin-Resistenz, „Lac I“ – Lac-Repressor-Gen, „P“ – T5-Promotor, „O“ – *E.coli*-Lac-Operator, „RBS“ – Ribosomen-Bindestelle, „MCS“ – „Multiple Cloning Site“, „t0“ und „t1“ – Terminatoren, „cat“ – Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen für Chloramphenicol-Resistenz. Abbildung verändert nach Heinemann, 1999.

4.2 Verwendete LHCII-Klone

Alle in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten LHCII-Klone stammen vom Klon D7f3 ab, welcher das mature, wildtypische Lhcb1-Protein darstellt (Dilly-Hartwig et al., 1998). Durch gezielten Aminosäureaustausch bzw. Insertion oder Deletion von Peptidsequenzen entstanden anschließend alle weiteren LHCII-Klone (Tabelle II.3). Die Fluoreszenzquantenausbeute des rekombinanten LHCII in Detergenzlösung wurde mit 0,2 bestimmt.

Tabelle II.3 Verwendete LHCII-Klone

Name	Beschreibung	Hersteller
Allgemeine Klone		
D7f3	Maturer LHCII (Ausgangsklon)	Dilly-Hartwig et al., 1998
C79S	C79S	Huschenbett, 2001
C79Sh	C79S C-terminaler „His ₆ -Tag“	Müller, 2008
ΔN22	Deletion der ersten 22 AS	Hobe et al., 1995
ΔN22h	Deletion der ersten 22 AS C-terminaler „His ₆ -Tag“	Bender, 2004
C3.2h	C-terminaler „His ₆ -Tag“	Kosemund, 1999
Cystein-Mutanten		
R1Ch	C79S, R1C C-terminaler „His ₆ -Tag“	<i>diese Arbeit</i>
S3Ch	C79S, S3C C-terminaler „His ₆ -Tag“	Huschenbett, 2001
S3Chh	C79S, S3C C-terminaler „His ₁₂ -Tag“	Plunger, 2007
S106Ch	C79S, S106C N-terminaler „His ₆ -Tag“	Storf, 2001
S160Ch	C79S, S160C C-terminaler „His ₆ -Tag“	Huschenbett, 2001
3xCh	C79S, S3C, S106C, S160C C-terminaler „His ₆ -Tag“	Wiegand, 2008
4xCh	C79S, S3C, S106C, S160C, V223C C-terminaler „His ₆ -Tag“	Wiegand, 2008
ZnS-Bindungsmutanten		
A7-N	C79S N-terminal: CNNPMHQNC-GGS	<i>diese Arbeit</i>
Z8-N	C79S N-terminal: LRRSSEAHNSIV-GGS	<i>diese Arbeit</i>
Z8-C	C79S C-terminal: GGS-LRRSSEAHNSIV	<i>diese Arbeit</i>

4.3 Weitere organische Komponenten

Neben den Bakterienstämmen, dem Vektor und LHCII-Klonen wurden auch weitere organische Komponenten verwendet. Hier sind zunächst die für die LHCII-Rekonstitution notwendigen Pigmente zu nennen. Diese wurden aus Erbsenpflanzen (*Pisum sativum* L.cv.Golf) isoliert. Ihre Eigenschaften sind in Tabelle II.4 dargestellt.

Außerdem wurde ein weiteres pflanzliches Protein benutzt. Das verwendete rekombinante WSCP („Water-soluble chlorophyll protein“) entspricht dem von Bektas (2010) hergestellten mBoWSCPhis und ist somit das mature WSCP aus Blumenkohl (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), welches zusätzlich einen N-terminalen „His₆-Tag“ besitzt.

Tabelle II.4 Eigenschaften der LHCII-Pigmente.

Pigment	Molekulargewicht [g/mol]	ϵ_{max} (Lösungsmittel) [cm ⁻¹ M ⁻¹]	Fluoreszenz- quanten- ausbeute
Chl a	893,48	74400 (96% EtOH) ¹	0,22 ²
Chl b	907,46	40000 (96% EtOH) ¹	~0,2
Lutein	568,43	-	-
Neoxanthin	600,42	-	-
Violaxanthin	600,85	-	-

¹Köst & Zweig, 1988, ² Seely & Conolly, 1986.

5 Molekularbiologische Methoden

Bei allen molekularbiologischen Methoden wurden ausschließlich sterile Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet. Zusätzlich erfolgten Arbeiten mit Bakterienkulturen unter der Sterilbank. Alle Laborgeräte, die mit Bakterienkulturen und -DNA in Berührung gekommen waren, wurden vor der Entsorgung durch Autoklavieren unschädlich gemacht.

5.1 Nährmedien und Platten

Die verwendeten Bakterienklone wurden in Form von Dauerkulturen (II5.8) gelagert. In diesen ist das Wachstum der Bakterien unterbrochen. Für eine erneute Verwendung wurden die Bakterien durch Nährmedien kultiviert. Ausgehend von einer Dauerkultur wurden sie zuerst auf einer Platte mit entsprechendem Medium und Antibiotika im Dreistrichverfahren mit Hilfe der Impföse ausgestrichen. Auf diese Weise erhielt man nach einer Inkubation über Nacht (ü.N.) bei 37°C vereinzelt Klone, die für Plasmidisolierungen (II5.2) oder Überexpressionen (II6.2) in Flüssigkulturen weiter verwendet wurden. Dafür wurde jeweils ein Klon mit einer gelben Pipettenspitze von der Platte gepickt und in eine Flüssigkultur mit entsprechendem Nährmedium und Antibiotika überführt. Hier erfolgte dann in der Regel ü.N. eine Inkubation (=Übernachtskultur) auf dem Schüttler bei 37°C und 150 Upm (Umdrehungen pro Minute).

Für Flüssigkulturen wurden die Nährmedien im gewünschten Volumen hergestellt, in Erlenmeyerkolben überführt und anschließend autoklaviert. Erst kurz vor Gebrauch wurde 1/1000 Volumen der entsprechenden Antibiotika-Stammlösungen hinzugegeben, da sie nicht hitzestabil sind. Für Platten wurde zusätzlich noch 1,5% (w/v) Agar in die Nährmedien gegeben. Nach dem Autoklavieren wurden die Medien abgekühlt und sobald sie handwarm waren, zunächst die Antibiotika hinzugefügt und anschließend die Medien in Petrischalen gegossen. Beim weiteren Abkühlen härteten die Platten dann aus.

Bei der Anzucht der *E.coli*-Stämme JM101 und BL21(DE3) wurde nur Ampicillin (Amp) verwendet, bei BL21 (DE3) pLysS-Stämmen zusätzlich auch Chloramphenicol (Cap). Üblicherweise wurde LB-Medium als Nährmedium benutzt, nur bei der Transformation der BL21-Stämme verwendete man SOC-Medium.

<u>Amp-Stammlösung</u>	100 µg/µl	in dH ₂ O, pH 8,0
<u>Cap-Stammlösung</u>	34 mg/ml	in 100% Ethanol
<u>LB-Medium</u>	1% (w/v)	Trypton
	0,5% (w/v)	Hefeextrakt
	1% (w/v)	NaCl
	Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen.	

<u>SOC-Medium</u>	2% (w/v)	Trypton
	0,5% (w/v)	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
	20 mM	Glukose
	Mit NaOH auf pH 7,0 einstellen.	

5.2 Plasmidisolation und DNA-Aufreinigung

Für Mutationen am LHCII-Gen musste das Plasmid, welches die LHCII-DNA trägt, aus den Bakterien isoliert werden. Hierfür wurden jeweils 15 ml einer Übernachtskultur (s. II5.1) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte anschließend bis auf die Elution nach Anleitung mit dem „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II (Classic-Line)“ der Firma Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen. Vor der Elution wurden letzte Tropfen der Puffer mit Küchenpapier entfernt und anschließend die DNA in zwei Schritten mit dH₂O, welches Raumtemperatur besaß, eluiert.

Um reine DNA-Proben zu erhalten und nach einer PCR (II5.4.2.2) oder einem Restriktionsverdau (II5.6) Enzyme oder Salze zu entfernen, erfolgte ebenfalls die Aufreinigung mit einem Kit. Hierbei wurde das „E.Z.N.A.[®] Cyle-Pure Kit (Classic-Line)“ derselben Firma verwendet. Auch hier wurde bis auf die Elution mit dH₂O nach Anleitung vorgegangen.

5.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration war für den Einsatz genauer DNA-Mengen in z.B. PCR-Ansätzen entscheidend. Sie erfolgte photometrisch mit dem BioPhotometer. Hierfür wurden die DNA-Ansätze je nach erwarteter Konzentration, meistens jedoch 35fach, mit dH₂O verdünnt. Bei einem minimalen zu vermessenden Volumen von 70 µl brauchte man daher je Messung 2 µl DNA-Probe. Durch die Bestimmung der Absorption bei 260 und 320 nm konnte dann mit folgender Gleichung die Konzentration doppelsträngiger DNA berechnet werden:

$$c(DNA) [\mu g / ml] = (A_{260} - A_{320}) * 50 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Bei 260 nm liegt das Maximum der Absorption der π -Elektronensysteme der DNA-Basen, bei 320 nm sollte dagegen keine Absorption zu messen sein. Diese Wellenlänge fungierte daher als Basislinie. Aufgrund der Tatsache, dass die aromatischen Aminosäuren von Proteinen ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm haben, kann bei der photometrischen Analyse zusätzlich die Reinheit der DNA-Probe bestimmt werden. Liegt der Quotient der Absorption bei 260 nm zu der Absorption bei 280 nm zwischen 1,8 und 2,0 hat man eine reine DNA-Probe.

5.4 Mutagenesen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Mutationen verwirklicht. Für die Herstellung der Cystein-Mutante R1Ch wurde eine Punktmutation durchgeführt, bei der Herstellung der ZnS-Bindungsmutanten erfolgte dagegen die Insertion von bis zu 45 Nukleotiden. Die Mutationen erfolgten bei beiden Vorgehensweisen mit verschiedenen Mutagenese-Kits durch PCR („polymerase chain reaction“) mit entsprechenden Primerpärchen (Tabelle II.5).

Tabelle II.5 Verwendete Mutagenese-Primer

Dargestellt sind die jeweiligen Primerpärchen („forward“ und „reverse“) für die neuen LHCII-Klone. Die Nukleotide, die nicht dem Originalvektor entsprechen, und daher nicht binden, sind hervorgehoben.

Neuer Klon	Primernamen	Sequenz
R1Ch	LHCII-R1C fwd	5'-GAG GAG AAA TTA AGC ATG TGT AAA TCT GCT ACC ACC AAG-3'
	LHCII-R1C rev	5'-CTT GGT GGT AGC AGA TTT ACA CAT GCT TAA TTT CTC CTC-3'
A7-N	A7 N-term +	5'- AAT TGT GGA GGA AGT CGT AAA TCT GCT ACC ACC AAG A-3'
	A7 N-term -	5'- TTG GTG CAT CGG ATT GTT GCA CAT GCT TAA TTT CTC CTC TT-3'
Z8-N	Z8 N-term +	5'- AGT CGT CGT TTA GGC GGA AGT CGT AAA TCT GCT ACC ACC AAG A-3'
	Z8 N-term -	5'- GCT TTC GGC ATG ATT GCT GAT GAC CAT GCT TAA TTT CTC CTC TT-3'
Z8-C	Z8 C-term +	5'- GCC GAA AGC AGC CGT CGT CTG TAA ACA CTC TTA TAT TTA TAT GT-3'
	Z8 C-term -	5'- ATG ATT GCT GAT CAC GCT TCC TCC TTT TCC GGG AAC AAA GTT G-3'

5.4.1 Klonierungsstrategie und Herstellung von R1Ch durch Punktmutation

Für die Herstellung der Cystein-Mutante R1Ch wurde das Arginin, welches N-terminal direkt nach dem ersten Methionin folgt, durch Punktmutation gegen ein Cystein ausgetauscht. Bei dieser Punktmutation wurde das entsprechende Triplet des Ausgangsklons C79Sh von CGT in TGT geändert. Die Klonierungsstrategie bei dieser Mutagenese enthielt eine PCR des gesamten Vektors. Dabei wurden Primer verwendet, die komplementär zueinander waren und in deren ungefähre Mitte die gewünschte Punktmutation lag. Diese entsprach somit nicht der Sequenz im Originalvektor. Da dies jedoch nur ein einziges Nukleotid betraf, lief die PCR dennoch effizient ab. Am Ende lag die gewünschte Punktmutation in einem doppelsträngigen Vektor vor, der allerdings an den jeweiligen Primeranfängen nicht geschlossen war (Abb. 2.5.1).

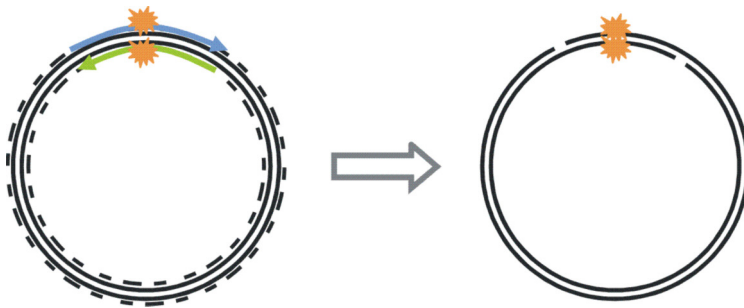


Abb. 2.5.1 Schema der Klonierungsstrategie für R1Ch.

Dargestellt ist die Lage der Punktmutation (orangefarbener Stern) in den Primern (blauer bzw. grüner Pfeil) und im anschließenden PCR-Produkt. Nach letzterer ist der Vektor an zwei Stellen nicht geschlossen.

Die Mutation wurde mit Hilfe des „QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene, La Jolla, USA durchgeführt. Dabei besteht die Mutagenese zunächst aus der PCR. Diese verläuft linear, das bedeutet, dass am Ende der Reaktion die mutierten Vektoren nicht überwiegen. Vielmehr ist der Prozentsatz des Ausgangsvektors noch sehr groß. Daher werden diese anschließend durch DpnI-Verdau entfernt. Das Restriktionsenzym DpnI verdaut ausschließlich methylierte und damit aus Bakterien stammende DNA. Der neu synthetisierte und mutierte Vektor wird dagegen nicht restringiert. Die so erhaltene Probe wird anschließend in superkompetente XL1-Blue Zellen transformiert. Diese sind zusätzlich in der Lage, den Vektor zu schließen.

Alle Komponenten der PCR, des DpnI-Verdaus und der anschließenden Transformation in XL1-Blue Zellen sind in dem Kit vorhanden, und es wurde genau nach Anleitung vorgegangen. Dabei wurden 50 ng Ausgangs-DNA in die PCR eingesetzt, und aufgrund der Länge des Vektors erfolgte die Herstellung des mutierten Plasmides durch 16 PCR-Zyklen mit einer Elongationszeit von 4:15 min. Nach der erfolgreichen Mutagenese befand sich das veränderte Plasmid in XL1-Blue Zellen. Diese sind jedoch nicht in der Lage das Wunschprotein zu exprimieren. Daher wurde das Plasmid isoliert und anschließend sowohl in JM101- als auch in BL21 (DE3)- und BL21 (DE3) pLysS-Zellen transformiert (II.5.2 und II.5.5). Zusätzlich wurde das isolierte Plasmid durch Sequenzierung auf seine Korrektheit hin überprüft (II.5.7).

5.4.2 Klonierungsstrategie der ZnS-Bindungsmutanten durch Insertion

Auch die ZnS-Bindungsmutanten wurden durch Mutagenese-PCR hergestellt. Die N- oder C-terminale Insertion der ZnS-Affinitätspeptide A7 und Z8 (Flynn et al., 2003; vgl. Tabelle III.2) erfolgte dabei am Ausgangsklon C79S durch 5'-überhängende Primer. Dabei wurde jeweils die Hälfte des gewünschten Inserts terminal an das PCR-Produkt gehängt (Abb. 2.5.2). Durch die erwünschte Insertion zu Beginn oder am Ende des LHCII-Ursprungsgens war die Lage der Primer festgelegt. Die Optimierung des GC-Gehalts der Primer, welcher für die Anlagerung während der PCR entscheidend ist, wurde dabei erschwert. Nach der erfolgreichen exponentiellen PCR lag das Produkt linear vor. Eine anschließende Ligation führte durch die Verwendung von 5' phosphorylierten Primern zum zirkulären Plasmid.

Dieses Plasmid wurde anschließend in kompetente JM101-Bakterien transformiert und sequenziert (II5.5 und II5.7).

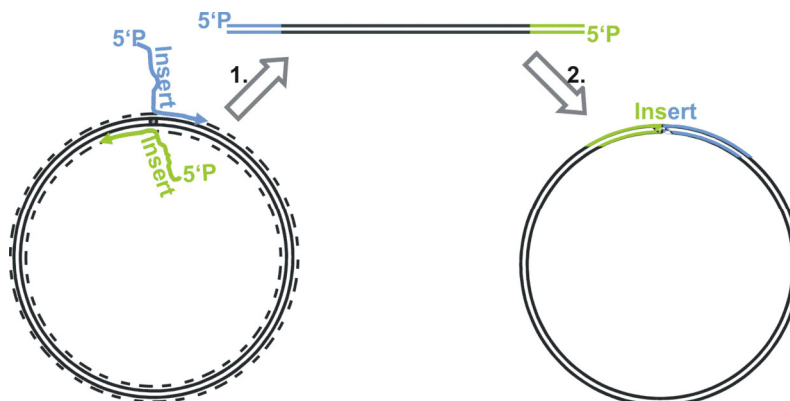


Abb. 2.5.2 Schema der Klonierungsstrategie für die ZnS-Bindungsmutanten.

In Schwarz ist der Originalvektor dargestellt, in blau bzw. grün jeweils die Hälfte des Inserts. 1. Schritt: Mutagenese-PCR, 2. Schritt: Ligation.

5.4.2.1 Herstellung von Z8-C mit dem „Phusion Mutagenesis Kit“

Für die Herstellung von Z8-C wurde das „Phusion Mutagenesis Kit“ von Finnzymes, vertrieben durch NEB (New England Biolabs), Bad Schwalbach, verwendet. Dabei wurde bis auf folgende Änderungen nach der Anleitung vorgegangen. Für eine erfolgreiche PCR wurden 150 pg Ausgangs-DNA eingesetzt. Außerdem wurde ein sogenannter „Hotstart“ durchgeführt. Dabei wurden zunächst nur die Ausgangs-DNA und der Puffer zusammengegeben und auf 98°C vorgeheizt. War diese Temperatur erreicht, wurden die zuvor gemischten Primer, dNTPs und die Polymerase hinzupipettiert. Durch diesen Schritt sollen unspezifische PCR-Produkte minimiert werden. Die Mutagenese-PCR lief nach dem in Tabelle II.6 dargestellten Programm ab.

Tabelle II.6 PCR-Programm für die Herstellung von Z8-C.

Beschreibung	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aktivierung	98°C	1 min	1x
Denaturierung	98°C	10 sec	
Anlagerung	43-45°C	30 sec	36x
Elongation	72°C	2,5 min	
End-Elongation	72°C	5 min	1x
DNA-Lagerung	4°C	unendlich	

Der Erfolg der PCR wurde über Agarose-Gelelektrophorese sichergestellt (II5.9). Die anschließende Ligation erfolgte mit 100 ng DNA und 1 µl der mitgelieferten Quick T4 DNA-Ligase in einem Endvolumen von 11 µl für 10 min bei Raumtemperatur. Für die Transformation des erhaltenen Plasmides in JM101 wurden schließlich 5 µl des Ligationsansatzes verwendet (II5.5).

5.4.2.2 Herstellung von A7-N und Z8-N mit dem „GC-rich“- Kit

Für die Herstellung von A7-N und Z8-N wurde das „GC-rich PCR System“ von Roche Applied Science, Mannheim verwendet, da mit dem „Phusion Mutagenesis Kit“ keine erfolgreiche PCR durchgeführt werden konnte. Das „GC-rich PCR System“ ist kein Mutagenese-Kit, sondern vielmehr ein Kit für die einfache PCR von GC-haltigen DNA-Proben. Es enthält aber DNA-Polymerasen, die in der Lage sind, über die komplette Länge des verwendeten Vektors DNA zu synthetisieren. Daher konnte die Mutagenese-PCR auch hiermit durchgeführt werden. Die Komponenten der weiterführenden Schritte waren allerdings nicht im Kit enthalten.

Für eine erfolgreiche Mutagenese-PCR mussten 100 ng Ausgangs-DNA eingesetzt werden. Außerdem wurden 0,3 μ M Primer verwendet und zusätzlich je 50 μ l PCR-Ansatz 5 μ l „GC resolution solution“ zugegeben. Ansonsten wurde nach Anleitung des Kits vorgegangen. Die PCR wurde nach dem in Tabelle II.7 angegebenen Programm durchgeführt.

Tabelle II.7 PCR-Programm für die Herstellung von A7-N und Z8-N.

Beschreibung	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aktivierung	95°C	3 min	1x
Denaturierung	95°C	30 sec	
Anlagerung	42-53°C	30 sec	35x
Elongation	68°C	3 min	
End-Elongation	68°C	7 min	1x
DNA-Lagerung	4°C	unendlich	

Durch die im Vergleich zur Z8-C-Herstellung fast 1000fach größere Menge an Ausgangs-DNA, musste diese vor der Ligation entfernt werden. Dafür wurde der PCR-Ansatz aufgereinigt (II5.2) und anschließend analog zur Mutagenese von R1Ch die Ausgangs-DNA durch DpnI-Verdau restringiert. Hierfür wurden dem gesamten aufgereinigten PCR-Ansatz (ca. 45 μ l) 5 μ l 10x NEB-Puffer 4 (NEB, Bad Schwalbach) und 1 μ l DpnI (20 U/ μ l; NEB, Bad Schwalbach) zugesetzt. Die Reaktion erfolgte über 1 h bei 37°C. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die DNA erneut aufgereinigt (II5.2).

Anschließend wurde zusätzlich ein „Proof-Reading“-Schritt durchgeführt. Im „GC-rich PCR System“ ist eine Taq-DNA-Polymerase enthalten, die ans Ende des PCR-Produkts mehrere Adenine anfügt. Um diese ungewollten Adenin-Überhänge zu entfernen, wurde dem restringierten und erneut aufgereinigten PCR-Produkt die Phusion-DNA-Polymerase aus dem „Phusion Mutagenesis Kit“ (NEB, Bad Schwalbach) zugefügt. Hierfür wurden 40 μ l PCR-Produkt mit 11 μ l 5x Phusion HF-Puffer (NEB, Bad Schwalbach), 4 μ l dNTPs (enthält 0,3 μ M von jedem) und 0,25 μ l Phusion-Polymerase gemischt. Anschließend erfolgte eine

Inkubation im PCR-Gerät für 5 min bei 50°C und dann 5 min bei 65°C. Die anschließende Ligation erfolgte mit der Ligase aus dem „Phusion Mutagenesis Kit“ (NEB, Bad Schwalbach) wie in II5.4.2.1 beschrieben. Bei der abschließenden Transformation in JM101-Zellen wurden 5 µl des Ligationsansatzes eingesetzt (II5.5).

5.5 Transformationen

Bei einer Transformation werden Plasmide in Bakterienzellen eingebracht. Dadurch erhalten die Bakterien neue DNA. Mit dieser Information können sie dann z.B. Proteine exprimieren, die eine Antibiotikaresistenz vermitteln. Es ist auch möglich, sie auf diese Weise ein Fremdprotein produzieren zu lassen. In dieser Arbeit wurden verschiedene *E.coli*-Stämme mit Plasmiden, die das LHCII-Gen kodieren, transformiert. Dadurch konnte der LHCII in diesen Bakterien überexprimiert werden (II6.2). Für eine erfolgreiche Transformation benötigt man kompetente Bakterienzellen. Darunter werden Zellen verstanden, die aufgrund einer gezielten Anzucht unter Mangelbedingungen poröse Zellwände haben und auf diese Weise die angebotenen Plasmide aufnehmen können. Transformationsprotokolle unterscheiden sich je nach dem verwendeten Bakterienstamm.

5.5.1 Transformation von JM101-Zellen

Für die Transformation von JM101-Zellen wurden jeweils 50 µl kompetenter Bakterien verwendet. Diese wurden bei -80°C gelagert und vor der Transformation ohne große Erschütterung auf Eis langsam aufgetaut. Anschließend wurden sie in 15 ml „Roundbottom“-Röhrchen überführt, durch leichtes Anschnipsen gemischt und das gekühlte Plasmid hinzugegeben. Hierbei wurden zwischen 15-50 ng DNA verwendet, das Volumen der DNA-Lösung lag jedoch auf jeden Fall unter 10 µl. Die Zugabe größerer Volumina hätte die Bakterienlösung zu stark verdünnt. Plasmid und Bakterien wurden wieder durch leichtes Anschnipsen gemischt und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Dieser Inkubation folgte ein 1-minütiger Hitzeschock bei 42°C, nach dem die Zellen wieder auf Eis abgekühlt wurden. Nun wurden 450 µl vorgewärmtes antibiotikafreies LB-Medium zugegeben und die Bakterien für eine Stunde bei 37°C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden 150-300 µl dieser Lösung auf ebenfalls vorgewärmten LB-Amp-Platten (II5.1) ausplattiert und ü.N. bei 37°C wachsen gelassen.

Durch die Aufnahme des Plasmides mit dem LHCII-Gen erhielten die Bakterien zusätzlich ein Amp-Resistenzgen. Daher konnten nur aus jenen Bakterien Kolonien entstehen, die das Plasmid aufgenommen hatten. Diese Kolonien wurden am nächsten Tag sichtbar, anschließend vereinzelt und in LB-Flüssigkulturen angezogen (II5.1).

5.5.2 Transformation von BL21 (DE3)

Die Transformation von BL21 (DE3)-Zellen erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei JM101-Zellen. Es wurden auch 50 µl kompetenter Bakterien eingesetzt, diese vorsichtig aufgetaut und anschließend 50 ng Plasmid-DNA hinzugefügt. Danach erfolgten eine Inkubation für 30 min auf Eis und ein Hitzeschritt bei 42°C für 45 sec. Die Bakterien wurden für 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend 450 µl vorgewärmtes SOC-Medium (II5.1) hinzugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurden 200 µl Bakterienlösung auf vorgewärmten LB-Amp-Platten (II5.1) ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Dabei wurden erst nach 6 Tagen Kolonien sichtbar.

5.5.3 Transformation von BL21 (DE3) pLysS

Auch die Transformation von BL21 (DE3) pLysS-Zellen erfolgte nach demselben Prinzip. Hier wurden jedoch nur 20 µl kompetenter Bakterien eingesetzt. Nach der Zugabe von 50 ng Plasmid-DNA wurden sie für 5 min auf Eis inkubiert und erhielten danach für 30 sec ein Hitzeschock bei 42°C. Nachdem die Bakterien für 2 min auf Eis abgekühlt worden waren, wurden 80 µl SOC-Medium (II5.1) hinzugegeben und die Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden 10-50 µl auf LB-Amp-Cap-Platten (II5.1) ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Nach 6 Tagen waren Kolonien auf der Platte sichtbar.

5.6 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme schneiden DNA spezifisch an entsprechenden Nukleotid-Sequenzen. Sie dienen Bakterien *in vivo* oft als Schutz gegen Fremd-DNA und werden in der Molekularbiologie für einen gezielten DNA-Abbau verwendet. In dieser Arbeit wurden Restriktionsverdau mit jeweils zwei Enzymen durchgeführt, um den Erfolg der Mutagenesen an möglichen Laufunterschieden der abgebauten DNA in einer Agarose-Gelelektrophorese (II5.9) zu bestätigen.

Tabelle II.8 Verwendete Restriktionsenzyme.

Es wurde jeweils ein sogenannter Doppelverdau durchgeführt. Je nach Ausgangs-DNA wurden die Enzymmischungen I oder II verwendet. Pfeile in den Sequenzen stellen die Schnittstellen dar.

	Enzym	Sequenz	Hersteller	Konzentration	Puffer	Zusatz
I	PstI	5'-CTGCA↓G-3'	NEB	20 U/µl	NEB 3-Puffer	100 µg/ml BSA
	XhoI	5'-C↓TCGAG-3'	NEB	20 U/µl		
II	EcoRI	5'-G↓AATTC-3'	Fermentas	10 U/µl	2xTango-Puffer	2facher XbaI-Überschuß
	XbaI	5'-T↓CTAGA-3'	Fermentas	10 U/µl		

Ein standardmäßiger Restriktionsansatz hatte ein Endvolumen von 15 μl . Es wurden 500 ng DNA mit 20 Enzym-Units verdaut und der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Die entsprechenden Enzyme, Puffer und Zusätze sind in Tabelle II.8 dargestellt.

5.7 Sequenzierungen

Zur Überprüfung der DNA-Sequenzen nach den durchgeführten Mutagenesen wurden diese sequenziert. Hier wurde das von Sanger et al. (1977) entwickelte Prinzip des Kettenabbruchs verwendet. Dabei wird eine PCR durchgeführt, bei der zusätzlich zu den üblichen dNTPs auch Nukleotide eingebaut werden, die erstens einen Fluorophor tragen und zweitens eine zusätzliche OH-Gruppe besitzen. Der Einbau letzterer führt zu einem Abbruch der Reaktion, da die Polymerase an diese Nukleotide keine weiteren anfügen kann. Auf diese Weise erhält man nach der PCR diverse Produkte verschiedener Länge. Durch die Verwendung basisspezifischer Fluorophore kann anhand der Fragmente die DNA-Sequenz rekonstruiert werden.

Die PCR-Abbruchprodukte wurde von der Firma GENterprise, Mainz analysiert. Die PCR wurde dagegen selber durchgeführt, wobei die DNA-Polymerase, der Puffer und die Nukleotide von GENterprise geliefert wurden (Tabelle II.9).

Tabelle II.9 Standardmäßiger Ansatz einer Sequenzier-PCR.

	Menge
Plasmid-DNA	300 ng
Primer (10 pmol/μl)	1 μl
BigDye Premix	2 μl
5x Sequenzierungspuffer	2 μl
Auffüllen mit dH₂O	auf 10 μl

Je nach Lage der Mutation und damit der veränderten und zu überprüfenden Sequenz wurden verschiedene Primer verwendet (Tabelle II.10). Oft wurde jedoch auch der Rest des LHCI-Genes sequenziert, um sicherzustellen, dass kein unerwünschter Nukleotidaustausch stattgefunden hat.

Tabelle II.10 Verwendete Sequenzier-Primer.

Primernamen	Sequenz	Bindestelle auf pDS12-Vektor in Bezug auf LHCI-Gen
DS23+	5'-ATT TGC TTT GTG AGC GG-3'	~20 Nukleotide „upstream“
DS178-	5'-GGA GTT CTG AGG TCA TTA CTG G-3'	~180 Nukleotide „downstream“
Seq105-	5'-CC ATC ATC TTG TAT TAG TGA ACC -3'	~105 Nukleotide „downstream“

Die Sequenzier-PCR wurde nach dem in Tabelle II.11 dargestellten Programm durchgeführt.

Tabelle II.11 PCR-Programm der Sequenzier-PCR

Beschreibung	Temperatur	Dauer	Zyklen
Deckel vorheizen	110°C		1x
Denaturierung	96°C	10 sec	30x
Anlagerung/Elongation	55°C	4 min	
Deckel vorheizen	OFF		1x
DNA-Lagerung	4°C	unendlich	

5.8 Dauerkulturen

Zur Lagerung von Bakterienklonen wurden Dauerkulturen hergestellt. Hierfür wurden 400 µl einer Übernachtskultur (II5.1) mit 600 µl sterilem 80% Glycerin gemischt. Die so präparierten Zellen können ohne Probleme über einen Zeitraum von mehreren Jahren bei -80°C gelagert werden.

5.9 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Größe und Reinheit von DNA-Fragmenten zu bestimmen, wurden diese in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dabei werden die DNA-Proben in Gele aus einem vernetzten Galactose-Polymer gegeben. Beim Anlegen einer Spannung laufen die DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode. Das vernetzte Polymer hält sie dabei je nach ihrer Größe mehr oder weniger auf. Kleinere Moleküle laufen also schneller als größere. Durch Inkubation mit Ethidiumbromid können die DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert nach Anregung mit UV-Licht. Es kann aber auch mit menschlicher DNA reagieren und ist krebserregend. Daher wurde es nur mit Handschuhen und ausgewählten Laborutensilien benutzt.

Standardmäßig wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Hierfür wurde 1 g Agarose mit 100 ml 1x TAE-Puffer gemischt und durch 2-3maliges Aufkochen mit der Mikrowelle gelöst. So lange die Mischung noch warm war, wurden daraus 9 mit Probekämmen versehene Minigele (7,5 cm x 5,5 cm) à 10 ml gegossen. Beim Abkühlen bildete sich das Gel. Diese Gele konnten über mehrere Tage im Kühlschrank feucht gelagert werden.

In die Probentaschen konnten bis zu 10 µl Probe aufgetragen werden. Hierfür wurden 20-200 ng DNA zu 1/9 mit Minigelauftragspuffer versetzt. Die dadurch beschwerten Proben konnten direkt aufgetragen werden. In der Regel wurden 5 µl DNA-Längenstandard verwendet (II2.2). Die Auftrennung der Moleküle erfolgte bei 0,15-0,19 V für ungefähr 45 min.

Anschließend wurden die Gele für 10 min im Färbebad inkubiert und überschüssiges Ethidiumbromid durch 10 min Waschen in dH₂O entfernt. Die Visualisierung der angefärbten Banden erfolgte in der VersaDoc (II7.2.5).

<u>10x TAE-Puffer</u>	400 mM	Tris
	1,14% (v/v)	Essigsäure
	2 mM	EDTA
<u>Minigelauftragspuffer</u>	0,025% (w/v)	Bromphenol-Blau
	0,025% (w/v)	Xylencyanol
	50% (v/v)	Glycerin
	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	10 mM	EDTA
<u>Färbebad</u>	0,5 µg/ml	Ethidiumbromid

6 Präparative biochemische Methoden

Die präparativen Methoden dieser Arbeit umfassten die Gewinnung von rekombinantem LHCII und die Herstellung von Hybridkomplexen aus LHCII und verschiedenen synthetischen Komponenten.

6.1 Isolation von Totalpigmentextrakt

Für die Rekonstitution von LHCP benötigte man native Pigmente (II6.6.1). Diese wurden aus Erbsenpflanzen (*Pisum sativum*) isoliert. Außerhalb der Pflanzenzelle können die Pigmente jedoch schnell oxidieren. Daher wurden alle Arbeiten mit freien Pigmenten möglichst zügig in abgedunkelten Räumen durchgeführt. Zusätzlich wurden die Proben wenn möglich gekühlt.

Für die Anzucht der benötigten Erbsen wurden diese zunächst ü.N. unter Luftzufuhr gequollen. Am folgenden Tag wurden sie auf feuchtem Vermiculit ausgesät und unter Langtagbedingungen (16 h Licht) bei 20°C angezogen. Hierbei war auf eine ausreichende Wasserversorgung zu achten. Nach 10 Tagen wurden die oberen Blätter geerntet und unter Zugabe von Aufschlusspuffer im „Waring Blender“ homogenisiert (für 1 kg Blattmaterial 2 l Puffer). Der homogenisierte Extrakt wurde bei 4°C durch 4-lagige Baumwollgaze filtriert und das Filtrat anschließend für 3 min bei 8000 Upm und 4°C zentrifugiert (Beckmann Kühlzentrifuge, Rotor JLA -10500). Der Überstand mit den löslichen Zellpartikeln wurde verworfen. Das entstandene Pellet wurde in 500 ml wasserfreiem Aceton (II2.1) resuspendiert und erneut für 10 min wie oben zentrifugiert. Nun befanden sich die gelösten Pigmente im Überstand. Um diese in einen komplett wasserfreien Zustand zu überführen, wurden sie in einen 1 l-Scheidetrichter überführt und dort portionsweise mit 500 ml Ether (II2.1) und dH₂O gemischt. Dabei lösten sich die Pigmente im Ether. Durch Invertieren des Gemischs wurde zusätzlich das Aceton aus der Ether- in die Wasserphase gezwungen. Dieser Prozess konnte durch Zugabe von etwas 5 M NaCl beschleunigt werden. Dieses löst sich im Wasser, macht es damit polarer und die Phasentrennung schärfer. Beim Invertieren musste jedoch darauf geachtet werden, dass keine Emulsion entstand, da diese dann in der Regel nicht mehr rückgängig gemacht werden konnte und die Pigmente, die sich dort befanden, verworfen werden mussten. Zusätzlich musste aufgrund des leicht flüchtigen Ethers regelmäßig gelüftet werden. Die bei der Phasentrennung entstandene farblose, wässrige Phase wurde abgelassen und die Etherphase noch dreimal mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde auch sie abgefüllt und ü.N. bei -80°C eingefroren. Dabei fror das restliche Wasser aus, während die Ether-Pigment-Lösung flüssig blieb. Am nächsten Morgen wurden die entstandenen Wasserkristalle zügig mit einer Wasserstrahlpumpe und vorgekühlter Porzellanfritte mit Filter entfernt. Die nun erhaltenen wasserfreien Pigmente wurden im Rotationsverdampfer vom Ether befreit und zu einer einheitlichen Schicht

eingetrocknet. In diesem Zustand konnten die Pigmente bei -20°C und Dunkelheit gelagert werden.

Der so erhaltene Totalpigmentextrakt enthielt neben allen photosynthetisch aktiven Pigmenten auch noch Lipidreste. Zur Analyse des Extraktes wurden die getrockneten Pigmente in wasserfreiem Aceton gelöst und durch analytische HPLC (II7.1.1) und UV-Vis Photometrie (II7.3.1) auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Zudem wurden anschließend Aliquots mit definierter Gesamtchlorophyllmenge hergestellt und unter Stickstoffstrom eingetrocknet. Auch diese Aliquots konnten bei -20°C und Dunkelheit gelagert werden.

<u>Aufschlusspuffer</u>	330 mM	Sorbitol
	25 mM	Tris/HCl pH 7,0
	1 mM	Dithiothreitol (DTT)

6.2 Überexpression von LHCP und Isolation als „Inclusion Bodies“

Durch Transformation mit Plasmiden, die das LHCII-Gen tragen, sind entsprechende *E.coli*-Klone in der Lage das LHCII-Apoprotein (LHCP) zu exprimieren (II5.5). Das LHCII-Gen wird unter normalen Bedingungen nicht transkribiert, da es unter der Kontrolle des Lac-Promotors steht. Durch Zugabe von IPTG (Isopropylthiogalaktosid) in die Bakterienkultur wird die Inhibition des Promotors jedoch aufgehoben und das Gen kann gezielt angeschaltet werden. Diese Expression ist so hoch, dass nach einer mehrstündigen Inkubation LHCP das hauptsächliche Protein im Bakterium ist. Damit dieses Fremdprotein den normalen Stoffwechsel nicht stört, wird es in sogenannten „Inclusion Bodies“ (IBs, Einschlusskörperchen) im Cytosol angehäuft. Für die spätere Nutzung des Proteins muss es anschließend aus den Bakterien isoliert werden.

6.2.1 Standardmäßige Überexpression und Isolation in JM101

Für die Überexpression der meisten LHCII-Klone in JM101 wurden 800 ml LB-Amp-Medium mit einer vereinzelt Bakterienkolonie angeimpft (II5.1). Diese wurde ü.N. bei 37°C und 220 Upm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die LHCP-Expression durch Zugabe von 800 µl einer 1 M IPTG-Lösung gestartet und die Kultur für weitere 4 h bei 37°C und 220 Upm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 5 min bei 8000 Upm und 4°C abzentrifugiert (Beckmann Kühlzentrifuge, Rotor JLA 10-500) und in 30 ml Lysispuffer resuspendiert. Nun wurden die Bakterienzellen mechanisch durch zwei Durchgänge mit der „French Press“ aufgeschlossen. Aus dem so erhaltenen Zellextrakt wurden im Folgenden durch Waschungen mit verschiedenen Puffern die unlöslichen LHCP-IBs isoliert. Dafür

wurde der Extrakt für 8 min bei 8000 Upm und 4°C (Beckmann Kühlzentrifuge, Rotor JA 20) zentrifugiert und das Proteinpellet zunächst in 30 ml Detergenzpuffer resuspendiert, erneut wie eben beschrieben zentrifugiert und dann in 30 ml Triton-Puffer aufgenommen. Diese Resuspension wurde  .N. bei 4°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde das Protein wieder zentrifugiert, in 30 ml Trispuffer aufgenommen, erneut zentrifugiert und schließlich in 2-4 ml Trispuffer resuspendiert. In diesem Zustand konnten die IBs bei -20°C aufbewahrt werden. Die Überprüfung der Reinheit erfolgte durch eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE; II7.2.2), die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Vis Photometrie (II7.3.1).

<u>Lysispuffer</u>	0,8 mg/ml	DTT
	4 �g/ml	DNase I
<u>Detergenzpuffer</u>	1% (w/v)	Desoxycholsäure
	1% (w/v)	Triton X-100 (TX)
	200 mM	NaCl
	20 mM	Tris/HCl pH 7,5
	10 mM	�-Mercaptoethanol (�-ME)
	2 mM	EDTA
<u>Tritonpuffer</u>	0,5% (w/v)	Triton X-100
	20 mM	Tris/HCl pH 7,5
	1 mM	EDTA
<u>Trispuffer</u>	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA

6.2.2 Überexpression und Isolation von R1Ch

Bei der Überexpression und Isolation von R1Ch musste wegen des Cysteins an der ersten Position hinter dem führenden Methionin das standardmäßige Protokoll leicht verändert werden. Diese Veränderungen wurde auf Grundlage der von Gentle et al. (2004) veröffentlichten Daten zur Expression von Proteinen mit N-terminalem Cystein durchgeführt. Für eine erfolgreiche Translation muss die erste Aminosäure der Peptidsequenz Methionin sein. Dieses wird jedoch oftmals anschließend abgespalten. Bei R1Ch befindet sich dann ein Cystein am N-Terminus. Dieses ist sehr reaktiv und besonders im Zusammenhang mit der Aminogruppe des N-Terminus kann es leicht modifiziert werden. Für die anschließend geplante Markierung von R1Ch wurde das Cystein jedoch im unmodifizierten Zustand benötigt. Daher wurden einige Veränderungen zum Schutz des N-terminalen Cysteins im Protokoll der Überexpression und Isolierung vorgenommen.

Für die Überexpression von R1Ch wurden 400 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit 20 ml einer frischen Übernachtkultur (II5.1) angeimpft. Die Expression von R1Ch erfolgte

sowohl in JM101 als auch in BL21 (DE3) und BL21 (DE3) pLysS. Bei Verwendung der letzteren enthielt das Nährmedium neben Amp auch Cap. Die erhaltene Hauptkultur wurde bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Nach 1-1,5 h wurden 4 ml einer frisch hergestellten Cysteinlösung hinzugegeben. Diese freien Cysteine sollten statt des N-terminalen Cysteins die möglichen Reaktionen eingehen und somit sozusagen als Puffer dienen. Anschließend wurde die Kultur weiter inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von mindestens 0,6 erreicht war. Dieses war nach insgesamt 2-3 h der Fall. Nun wurden weitere 2 ml Cysteinlösung zugegeben und die Proteinexpression durch Zugabe von 400 µl 1 M IPTG gestartet. Nach einer weiteren Inkubation für 2 h wurden die Bakterienzellen 5 min bei 8000 Upm und 4°C (Beckmann Kühlzentrifuge, Rotor JLA 10-500) abzentrifugiert und anschließend in 10 ml R1Ch-Lysispuffer resuspendiert. Dieser Puffer enthielt MMTS (Methylmethanethiosulfonat), welches reversibel mit Cysteinen, inklusive des N-terminalen Cysteins, reagiert. Letzteres wurde auf diese Weise vor anderen Modifikationen geschützt. Diese Interaktion konnte durch Zugabe von Reduktionsmitteln wie β-ME, DTT, TCaEP oder TCyEP rückgängig gemacht werden. Man erhielt dann wieder die freie, reduzierte SH-Gruppe. Die anschließende Isolation des exprimierten LHCP erfolgte wie im standardmäßigen Protokoll durch „French Press“ und anschließende Waschungen mit verschiedenen Puffern (II.6.2.1). Jedoch wurde für die Inkubation ü.N. dem Tritonpuffer auch 10 mM MMTS zugesetzt.

Die Abspaltung des ersten Methionins muss nicht vollständig erfolgen. Der Prozentsatz an verkürzten R1Ch-Proteinen wurde daher durch N-terminalen Edman-Abbau bestimmt. Dabei erhielt man Aminosäuren, die mit Phenylthiohydantoin verknüpft waren. Nach jedem Abbauschritt, wurden diese durch HPLC („high performance liquid chromatography“) mit einer „reversed phase“ C18-Säule aufgetrennt und ihre Absorption bei 270 nm mit Aminosäurestandards verglichen. Der Edman-Abbau und die HPLC-Analyse wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Friedrich Lottspeich am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried durchgeführt.

Cysteinlösung

1 M Cystein
mit NaOH auf pH 7,0 einstellen
immer frisch ansetzen

R1Ch-Lysispuffer

4 µg/ml DNase I
10 mM MMTS

6.3 Farbstoffmarkierungen am LHCII

Die Herstellung von Hybridkomplexen aus LHCII und Fluoreszenzfarbstoffen stellte einen zentralen Punkt der vorliegenden Arbeit dar. Dabei wurde meistens eine kovalente Bindung zwischen Protein und Farbstoff gewählt. Diese konnte durch verschiedenste aktive Gruppen des Farbstoffs zu unterschiedlichen Aminosäuren des Proteins ausgebildet werden. Weiterhin erfolgte die Proteinmarkierung je nach Reaktion am denaturierten Apoprotein oder aber am rekonstituierten Pigment-Protein-Komplex.

6.3.1 Herstellung von Farbstoffstammlösungen

Für die Verwendung in Markierungsreaktionen wurden aus den lyophilisierten Farbstoffen konzentrierte Farbstoffstammlösungen hergestellt. Hierfür wurden in der Regel 20-50 µl Lösungsmittel in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt. Mit einem Spatel wurden dann vorsichtig geringe Mengen des lyophilisierten Farbstoffs in das Lösungsmittel überführt, bis die Lösung eine intensive Farbe angenommen hatte. Die Konzentration der Stammlösung wurde anschließend über Verdünnungen photometrisch bestimmt (II7.3.1).

In der Regel wurden Farbstoffkonzentrationen von 10-40 mM angestrebt. Je höher die Konzentration der Lösung, desto geringer war auch das Volumen, das in den Markierungsreaktionen eingesetzt werden musste, so dass es zu vernachlässigbaren Verdünnungen des Markierungsansatzes kam.

Für die Farbstoffe Rho-Mal, Rho-NHS, DY731 und Bodipy-IAA wurde DMSO als Lösungsmittel verwendet, für TMIMA und DNQDI dagegen DMF. Die entsprechenden Farbstofflösungen konnten für mehrere Monate bei -20°C trocken gelagert werden. Die wasserlöslichen Farbstoffe PDI-Mal, PDI-NHS, PDI-TE, PDI-NTA, TDI-Mal und TDI-nf wurden dagegen in dH₂O gelöst und immer direkt verwendet.

6.3.2 Cysteinreaktive Markierung am Apoprotein

Die cysteinreaktive Markierung am Apoprotein wurde mit allen Maleimidfarbstoffen durchgeführt. Hierbei greift die Thiolgruppe des Cysteins in einer sogenannten Michaelis-Addition die Doppelbindung des Maleimides an und es kommt zu einer kovalenten Bindung zwischen Protein und Farbstoff (Abb. 2.6.1).

Nach einem ähnlichen Prinzip funktioniert die Reaktion zwischen Cysteinen und Bodipy-Iodacetamid (Bodipy-IAA). Für eine erfolgreiche Reaktion müssen in beiden Fällen die Cysteine des Proteins reduziert sein. Daher erfolgte die Markierung des Proteins immer in zwei Schritten. Zunächst wurde das Protein reduziert, anschließend der Farbstoff hinzugegeben und beide Komponenten für einen gewissen Zeitraum inkubiert.

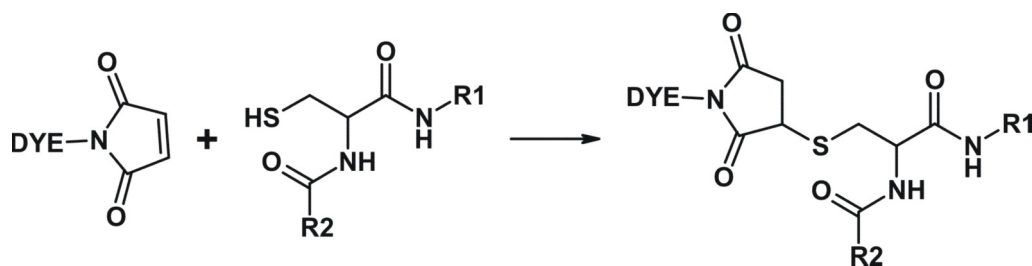


Abb. 2.6.1 Schema der Reaktion von Maleimiden mit Cysteinen.

Dabei stehen R1 + R2 für jeweilige Proteinreste, DYE für einen beliebigen Farbstoff.

Im Folgenden soll eine standardmäßige Markierung von 300 µg LHCP einer Einzel-Cystein Mutante beschrieben werden. Hierfür wurde die entsprechende Menge IB-Lösung kurz mit der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand abgenommen und verworfen. Auf das pelletierte Protein wurden 150 µl 1%iger LDS (Lithiumdodecylsulfat)-Lösung gegeben und das Protein durch Vortexen und Ultraschallbehandlung gelöst. Nun wurden 60 µl 100 mM NaP (Natriumphosphat)-Puffer und 84 µl dH₂O hinzugegeben. Zur vollständigen Denaturierung des Proteins wurde die Probe zunächst 1 min bei 100°C gekocht und dann reduziert. Hierfür wurde die Proteinklösung mit 6 µl 100 mM TCyEP (in DMF) versetzt und für 2 h bei 37°C im Drehrad inkubiert. Anschließend wurde der Farbstoff im gewünschten molaren Überschuss hinzugegeben und der Ansatz im Drehrad bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt wurde für jeden verwendeten Farbstoff optimiert und eventuell verändert. Dabei ergaben sich unterschiedliche Farbstoffmengen und Inkubationszeiten (Tabelle II.12). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben gefällt und aufgereinigt (II.6.4).

Tabelle II.12 Optimierte Variationen in der cysteinreaktiven Markierung am Apoprotein.

Angegeben sind die molaren Farbstoffüberschüsse im Vergleich zum Protein und die Inkubationszeit bei der Markierung mit den jeweiligen Farbstoffen. PDI-Mal und TDI-Mal wurden in zwei Portionen zu dem Protein gegeben. Der TMIMA-Markierungsansatz wurde zunächst im Ultraschallbad (US) inkubiert.

Farbstoff	Molarer Farbstoffüberschuss	Inkubation
PDI-Mal	7,5x + 7,5x	3 h + ü.N.
TDI-Mal	7,5x + 7,5x	3 h + ü.N.
TMIMA	30x	3 h US + ü.N.
DNQDI	20x	min. 3 h
Rho-Mal	15x	min. 3 h
DY-731	15x	min. 3 h
Bodipy-IAA	50x	min. 3 h

Bei der Markierung von Mehrfach-Cystein Mutanten wurden die TCyEP- und Farbstoffmengen mit der Cysteinanzahl multipliziert. Auf diese Weise konnte von einer vergleichbar effizienten Reduzierung und Markierung des Apoproteins ausgegangen werden.

6.3.3 Cysteinreaktive Markierung am Pigment-Protein-Komplex

Die Markierung mit Maleimidfarbstoffen konnte auch am Pigment-Protein-Komplex erfolgen. Diese Vorgehensweise war vor allem bei Mehrfach-Cystein Mutanten sinnvoll, da die Gefahr bestand, dass die zahlreichen kovalent gebundenen Farbstoffe die korrekte Faltung des Pigment-Protein-Komplexes beeinträchtigen. Generell konnten sowohl gefaltete Monomere als auch Trimere markiert werden. Beide Markierungsmethoden wurden im Laufe der Arbeit optimiert (vgl. III1.2.1.1). Hier soll die jeweils erfolgreichste Vorgehensweise dargestellt werden.

Markierung von Monomeren

Für die Markierung von gefalteten LHCII-Monomeren wurden die Proteine durch eine veränderte Detergenz-Wechsel Rekonstitution gefaltet (II6.6.1). Dabei wurde die Protein- und Pigmentmenge verdoppelt. Außerdem wurde statt des üblichen β -ME je 250 μ g Protein 5 μ l 100 mM TCyEP (in DMF) verwendet. Der Rest des Protokolls blieb unverändert. Nach der abschließenden Zentrifugation wurde der erhaltene Überstand inklusive der gewünschten Monomere mit den üblichen molaren Farbstoffüberschüssen im Vergleich zum eingesetzten Protein versetzt (Tabelle II.12) und die Ansätze für mindestens 5 h bei 4°C auf der Drehscheibe inkubiert. Die Aufreinigung der Komplexe erfolgte über Ultrazentrifugation mit Saccharosedichtegradienten (II6.7).

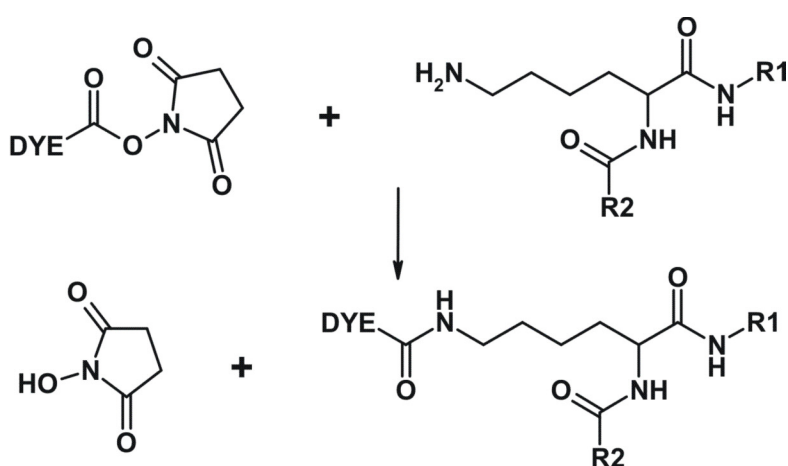
Markierung von Trimeren

Die Markierung von Trimeren mit Maleimidfarbstoffen wurde im Rahmen der Staatsexamensarbeit von Dominik Christian optimiert (Christian, 2008). Dabei wurden LHCII-Trimere nach den üblichen Protokollen der Detergenz-Wechsel Rekonstitution und der Trimerisierung durch Affinitätschromatographie hergestellt (II6.6.1 und II6.6.3). Anschließend wurde photometrisch die Konzentration an LHCII im Ni-Säuleneluat abgeschätzt (II7.3.1). Entsprechend der Proteinmenge wurde analog zu II6.3.2 TCyEP und Farbstoff in die Probe gegeben. Dabei wurde die Farbstoffmenge zunächst nur zur Hälfte zugegeben, der Ansatz für 3 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde der restliche Farbstoff hinzugegeben und weitere 3 h wie oben inkubiert. Die Aufreinigung der Komplexe erfolgte über Ultrazentrifugation mit Saccharosedichtegradienten (II6.7).

6.3.4 Aminoreaktive Markierung am Pigment-Protein-Komplex

Die aminoreaktive Markierung vom LHCII stellte eine Alternative zur Markierung mit Mehrfach-Cystein Mutanten und Maleimidfarbstoffen dar. Hierfür wurden Farbstoffe mit N-Succinimidylestern (NHS) als reaktiver Gruppe verwendet. Diese können mit deprotonierten

Aminogruppen reagieren, wobei der Farbstoff anschließend kovalent mit dem Protein verbunden ist (Abb. 2.6.2). Je nach verwendetem pH sind mehr oder weniger Aminogruppen am Protein deprotoniert und somit potentiell markierbar. Bei neutralem pH ist voraussichtlich nur die Aminogruppe des N-Terminus deprotoniert, bei höheren pH-Werten auch die Aminogruppen der Lysine. In dieser Arbeit sollten optimaler Weise alle im Pigment-Protein-



Komplex zugänglichen Lysine markiert werden, daher wurde die Reaktion im leicht basischen Bereich durchgeführt.

Abb. 2.6.2 Schema der Reaktion von NHS-Estern mit deprotonierten Lysinen. Dabei stehen R1 + R2 für jeweilige Proteinreste, DYE für einen beliebigen Farbstoff.

Für die Markierung wurden Trimere verwendete, die durch standardmäßige Rekonstitution und Trimerisierung hergestellt worden waren (II6.6.1 und II6.6.3). Bei der Aufreinigung der Trimere durch Ultrazentrifugation wurde der pH für die nachfolgende Reaktion mit aminoreaktiven Farbstoffen festgelegt (II6.7). Hierbei durften keine Puffer mit Aminogruppen verwendet werden, da diese auch mit dem Farbstoff reagieren können. Daher wurde NaP- (pH 8,5) bzw. Na-Boratpuffer (pH 9,5) benutzt. Die aufgereinigten Trimere konnten direkt in die Markierungsreaktion eingesetzt werden. Hierfür wurde einfach der Farbstoff zu den Trimeren gegeben und die Probe anschließend inkubiert. In der Regel wurde ein 20fach molarer Überschuss der Farbstoffe verwendet und die Probe für 3 h auf Eis inkubiert. Die besten Ergebnisse wurden allerdings mit einem 100fach molaren Überschuss und einer Inkubation bei 20°C erreicht (vgl. III1.2.2.4).

Für die Charakterisierung der erhaltenen aminomarkierten Komplexe mussten nach der Inkubation überschüssige Farbstoffmoleküle entfernt werden. Dabei wurden verschiedene Methoden verwendet. Bei der Fällung der Komplexe wurden diese komplett zerstört und man erhielt das denaturierte, markierte Protein (II6.4). Für die weitere Verwendung der markierten LHCI stellte sich dagegen die Aufreinigung durch Ultrazentrifugation als optimale Methode heraus (II6.7, vgl. III1.2.2.4). In der Regel wurden allerdings zwei andere Vorgehensweisen gewählt:

Für die Entfernung von überschüssigem PDI-NHS wurde ein sogenannter „Solid support“ verwendet. Dieser bestand aus Polystyren-Kügelchen mit einem ungefähren Durchmesser

von 75 µm, die auf ihrer Oberfläche Aminogruppen präsentieren und auf diese Weise mit überschüssigem Farbstoff reagieren können (TentaGel HL NH₂, Rapp Polymere, Tübingen). Durch eine anschließende Zentrifugation kann der „Solid support“ zusammen mit dem Farbstoff aus der Probe entfernt werden. Bei der Verwendung in dieser Arbeit wurden je 500 µl Probe 3 Spatelspitzen „Solid support“ verwendet. Beides wurde durch Vortexen gemischt und für 2-5 min auf Eis inkubiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 1 min bei 10000 Upm mit der Tischzentrifuge in „Pierce® Spin Cups“ (mit Cellulose-Acetat Filtern, Thermo Scientific, Waltham, USA). Um die Mischung aus Probe und „Solid support“ nicht pipettieren zu müssen, erfolgte bereits die Inkubation beider Komponenten im „Spin Cup“. In der Regel wurde die Aufreinigung mindestens einmal wiederholt.

Die Entfernung von Rho-NHS war mit „Solid support“ nicht erfolgreich und erfolgte daher über eine Gelfiltration. Hierfür wurde Sephadex G25 (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalford, U.K.) als Säulenmaterial verwendet. Dieses wurde ü.N. mit dem Saccharosegradientenpuffer (II6.7) gequollen, in dem sich die Trimere nach der Ultrazentrifugation befanden und anschließend in Chromatographiesäulen (Poly-Prep Columns, BioRad, München) gefüllt. Für 500 µl Probe wurde dabei ein Säulenvolumen von 2 ml verwendet. Nachdem das Material mit dem Puffer äquilibriert war, wurde die Probe aufgetragen. War diese in die Säule eingelaufen, wurde mit demselben Puffer gewaschen. Dabei wurde nur das grüne Eluat, welches vor dem freien Farbstoff durch die Säule läuft, aufgefangen und weiter verwendet. Auch diese Aufreinigung wurde mindestens einmal wiederholt.

6.3.5 „Native chemische Ligation“ am Apoprotein

Die Markierung von LHCP durch eine „native chemische Ligation“ konnte nur mit dem Klon R1Ch durchgeführt werden. Bei dieser Reaktion benötigt man ein unmodifiziertes N-terminales Cystein. Daher erfolgte auch die Überexpression dieses Klons nach einem leicht veränderten Protokoll (II6.2.2). Bei der „nativen chemischen Ligation“ reagiert ein Thioester mit der Thiolgruppe des endständigen Cysteins. Durch eine spontane Umlagerung entsteht nachfolgend eine Peptidbindung als kovalente Bindung (Dawson et al., 1994; Abb. 2.6.3). Aus diesem Grund wird diese Reaktion häufig bei der Peptidsynthese verwendet. Sie kann aber auch, wie in dieser Arbeit, für die Markierung mit Farbstoffen genutzt werden. Im Laufe der Arbeit wurde die Markierung von R1Ch mit PDI-TE optimiert, nachfolgend soll das erfolgreichste Protokoll anhand der Markierung von 400 µg Protein genauer beschrieben werden (vgl. III3.1.2).

Wie in II6.3.1 beschrieben, wurde eine PDI-TE-Stammlösung in dH₂O hergestellt und die Konzentration photometrisch bestimmt. Von dieser Stammlösung wurden 75 nmol Farbstoff (5fach molarer Farbstoffüberschuss) entnommen und in der „Speed Vac“ getrocknet (30 min, mit Hitze). Parallel wurden 400 µg R1Ch-IBs mit der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet in 7,5 µl NCL-Puffer gelöst (Proteinkonzentration 2 mM). Die vorbereitete Proteinlösung wurde auf den getrockneten

Farbstoff gegeben und dieser ebenfalls darin gelöst. Anschließend wurden dem Ansatz 0,3 µl Thiophenol (Endkonzentration 4% (v/v)) zugegeben und alles für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Protein mit der „Wasserfällung“ aufgereinigt (II6.4.2) und anschließend markierte und unmarkierte R1Ch durch präparative Gelelektrophorese getrennt (II6.5).

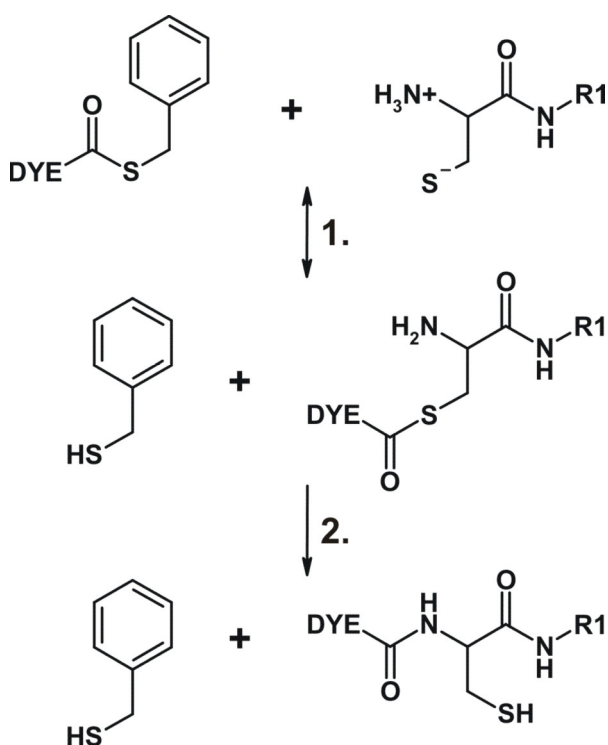


Abb. 2.6.3 Schema der Reaktion von Thioestern mit N-terminalen Cysteinen.

Dabei steht R1 einen Proteinrest und DYE für einen beliebigen Farbstoff. Der erste Schritt der Reaktion (1.) ist eine reversible, chemoselektive Reaktion. Diese wird durch die spontane Umlagerung im zweiten Schritt (2.) irreversibel.

NCL-Puffer

8 M
80 mM

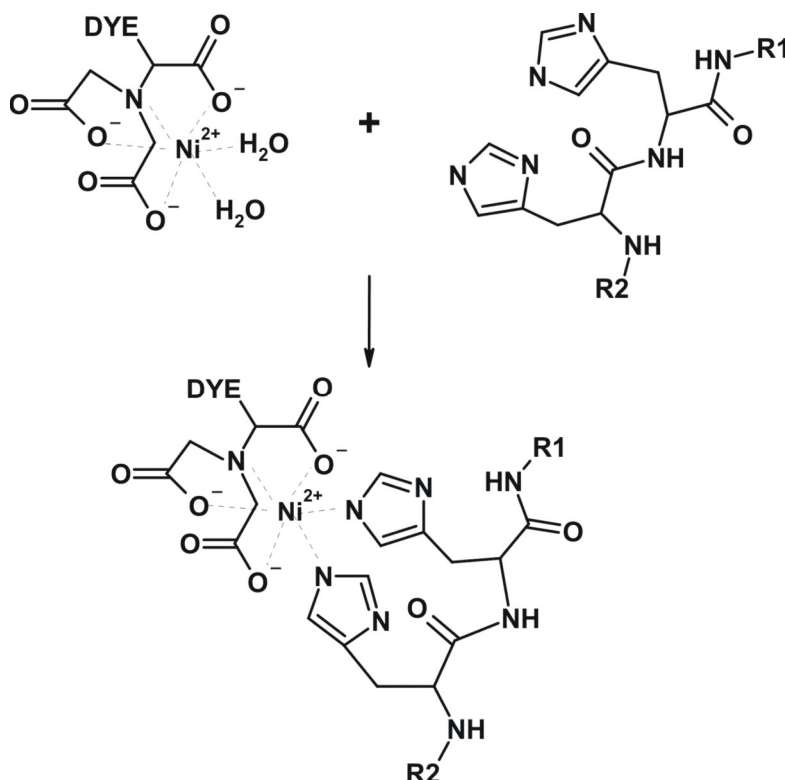
GuHCl
NaP pH 7,5

6.3.6 Markierung von „His-tag“-Proteinen im SDS-PA-Gel

Mit Hilfe des Farbstoffs PDI-NTA wurde untersucht, ob es möglich ist, „His-tag“-Proteine mit dem Farbstoff direkt im SDS-PA-Gel zu detektieren. Bei einer positiven Reaktion kommt es zu einer Komplexbildung zwischen den Histidinen des „His-tags“ und Ni²⁺-Ionen, die mit der NTA-Gruppe des Farbstoffs interagieren (Abb. 2.6.4).

Für die Markierung von „His-tag“-Proteinen im SDS-PA-Gel wurden entsprechende LHCII-IBs durch eine standardmäßige denaturierende SDS-PAGE im PA-Gel aufgetrennt (II7.2.2). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das PA-Gel zunächst zweimal für 5 min in dH₂O gewaschen, um den Elektrophoresepuffer aus dem Gel zu entfernen. Dieser und alle weiteren Wasch- und Inkubationsschritte wurden auf dem Schüttler durchgeführt. Anschließend wurde das Gel durch einmalige Inkubation in 10 mM NaP-Puffer für die

Markierung mit dem Farbstoff vorbereitet. Dabei wurde entweder Puffer mit pH 7,5 oder mit pH 8,5 verwendet. Die Inkubation mit dem Farbstoff erfolgte für 30 min. Hierbei wurden 1,5 nmol mit Ni^{2+} -Ionen komplexiertes PDI-NTA in 15 ml 10 mM NaP-Puffer des gewünschten pH gelöst und zu dem PA-Gel gegeben. Nach Beendigung der Markierung



wurde das PA-Gel bis zu viermal für 5 min mit Puffer gewaschen. Zur Auswertung der Markierung wurde direkt nach der Inkubation mit dem Farbstoff sowie nach jedem der anschließenden Waschschrirte die Fluoreszenz des Gels mit der VersaDoc aufgenommen (II7.2.5) und abschließend die aufgetrennten Proteine mit Coomassie gefärbt (II7.2.4).

Abb. 2.6.4 Schema der Komplexbildung von Ni-NTA-Gruppen mit Histidinen.

Dabei stehen R1 + R2 für jeweilige Proteinreste, DYE für einen beliebigen Farbstoff.

6.4 Proteinfällungen

Zur Aufreinigung von Proteinen können diese gefällt und durch anschließende Zentrifugation pelletiert werden. Der Puffer mit all seinen Bestandteilen bleibt dabei in der Regel im Überstand zurück. Durch anschließende Waschschrirte können letzte Reste entfernt und anschließend das Protein im gewünschten neuen Puffer aufgenommen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteinfällungen vor allem nach Markierungsreaktionen verwendet, um auf diese Weise überschüssige Farbstoffmoleküle zu entfernen. Dabei kamen zwei verschiedene Fällungen zum Einsatz.

6.4.1 Saure Acetonfällung

Bei der sauren Acetonfällung wurde der Proteinansatz mit 1/10 des Volumens an 100 mM Essigsäure und dem 2,3fachen Volumen an 100% Aceton versetzt. Anschließend wurde das Protein durch eine mindestens 3 h dauernde Inkubation bei -20°C gefällt. Die Aufreinigung des Proteins erfolgte durch 10 min Zentrifugation bei 4°C und 16000 Upm (Hettich Kühlzentrifuge, Rotor 1195). Der Überstand wurde verworfen, das erhaltene Proteinpellet in

der Regel in kaltem 70% Ethanol durch Vortexen und Ultraschallbehandlung resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde mehrere Male wiederholt. Bei der Aufreinigung von markiertem Protein wurde solange gewaschen, bis der Überstand nach der Zentrifugation farblos war. Die verwendeten Farbstoffe waren in Ethanol löslich und ein farbloser Überstand bedeutete, dass sich kein überschüssiger Farbstoff mehr in der Probe befand. Anschließend wurde ein letzter Waschschrift mit kaltem 100% Ethanol durchgeführt und nach dem Abnehmen des Überstandes das Protein für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Das auf diese Weise aufgereinigte Protein konnte in jedem SDS/LDS-haltigen Puffer je nach weiterer Verwendung resuspendiert und gelöst werden.

Bei der Aufreinigung von DNQDI- und TMIMA-markierten LHCP-Proben erfolgten alle Waschschriffe aufgrund der geringen Löslichkeit der Farbstoffe in Ethanol mit kaltem 100% Aceton.

6.4.2 „Wasserfällung“

Die saure Acetonfällung konnte nicht durchgeführt werden, sobald sich in den Proteinproben GuHCl befand. Dies betraf z.B. R1Ch-IBs nach der N-terminalen Markierung mit PDI-TE. Stattdessen wurden die LHCPs durch eine Verdünnung des GuHCl ausgefällt. Hierbei wurde die Probe mit dem 25fachen Volumen an dH₂O versetzt und anschließend 5 min bei 10000 Upm mit der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in demselben Volumen dH₂O durch Vortexen und Ultraschallbehandlung resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde solange wiederholt, bis der Überstand farblos war. Anschließend konnte das Pellet in SDS-haltigem Puffer aufgenommen und weiterverwendet werden.

6.5 Präparative Gelelektrophorese

Für die Präparative Gelelektrophorese wurde die „Mini Prep Cell“ von BioRad, München verwendet. Dabei wird die Proteinprobe in einem zylindrischen PA-Gel aufgetrennt und die Elektrophorese solange durchgeführt, bis die Proteinproben aus dem Gel laufen. Dieses Eluat wird in Fraktionen gesammelt und kann anschließend analysiert werden. In dieser Arbeit wurde die präparative Gelelektrophorese verwendet, um PDI-markiertes R1Ch von unmarkiertem R1Ch zu trennen. Dies war möglich, da beide ein unterschiedliches Laufverhalten in der Gelelektrophorese aufwiesen.

6.5.1 Herstellen des präparativen PA-Gels

Beim Herstellen des zylindrischen PA-Gels musste darauf geachtet werden, dass im Gel keine Luftblasen eingeschlossen wurden, da diese in der späteren Gelelektrophorese ungleichmäßige Laufeigenschaften der Proben zur Folge hätten. Um dieses Risiko zu minimieren, wurde der leere Gelzylinder an der vorgesehenen Halterung befestigt und beides in eine Waschschüssel gestellt. Anschließend wurde die Schüssel mit Wasser und Eis aufgefüllt, um eine Kühlung des Gels während der Polymerisation zu gewährleisten.

Zum Gießen des Gels wurde der Gelzylinder aus der Schüssel genommen. Das Trenngel wurde, wie angegeben, in eine kleine Saugflasche pipettiert (Tabelle II.13). Dabei wurden zunächst nur Acrylamid, Puffer und Wasser zusammengegeben und diese Mischung entgast. Anschließend wurden APS und TEMED als Reaktionsstarter und Katalysator hinzugefügt und alles mit einem an einer Spritze befestigten Schlauch luftblasenfrei in den Gelzylinder gegossen. Das Trenngel sollte dabei 8-8,5 cm hoch sein. Letzte Luftblasen wurden durch vorsichtiges Klopfen des Gelzylinders auf dem Untergrund entfernt. Zum Auspolymerisieren wurde das Gel mit 200 µl einer 50:50-Mischung aus dH₂O und Isopropanol überschichtet und zur Kühlung in die Waschschüssel gestellt. Nach 1-2 h wurde das Wasser-Isopropanol-Gemisch einem Filterpapier vollständig entfernt. Die Lösungen für das Sammelgel wurden wie fürs Trenngel beschrieben gemischt, entgast und auf das Trenngel gegeben. Es sollte ungefähr 1-1,5 cm hoch sein. Auch hier wurde das Gel zum Luftausschluss mit 200 µl des Wasser-Isopropanol-Gemisches überschichtet und für 1-2 h auspolymerisiert.

Das fertige Gel konnte direkt verwendet werden. Für eine Nutzung am nächsten Tag wurde etwas PräpGE-Laufpuffer (II.6.5.2) auf das Gel pipettiert, es mit einem umgedrehten 1,5 ml-Reaktionsgefäß abgeschlossen und bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle II.13 Zusammensetzung des PA-Gels bei der präparativen Gelelektrophorese.

	Trenngel (5 ml)		Sammelgel (5 ml)	
	Volumen	Endkonz.	Volumen	Endkonz.
30% Acrylamid / 1% Bisacrylamid	2,5 ml	15%	783 µl	4,7%
1 M Tris/HCl pH 8,8	2,05 ml	410 mM	-	
1 M Tris/HCl pH 6,8	-		650 µl	130 mM
dH₂O	418 µl		3,542 ml	
10% APS	30 µl	0,06%	22,5 µl	0,045%
TEMED	2 µl	0,04%	2,25 µl	0,045%

6.5.2 Durchführung der präparativen Gelelektrophorese

Für die Durchführung der präparativen Gelelektrophorese wurde die Kammer laut der Herstellerangaben zusammengebaut. Vorher waren die Fritte und die Membran in PräpGE-Laufpuffer äquilibriert worden. Die aufzutrennende Probe (maximal 200 µg) wurde mit Sparmix ohne Bromphenolblau (II7.2.2) denaturiert und beschwert. So vorbereitet wurde sie mit einer Kanüle auf das Gel aufgetragen. Anschließend wurde die Kammer laut Anweisung mit Laufpuffer gefüllt und die Gelelektrophorese gestartet. Diese wurde bei 10°C mit einer konstanten Stromstärke von 5 mA durchgeführt, die maximale Spannung war auf 300 V festgelegt. Mit einer Pumpe wurde das Eluat aus der Gelkammer in den Fraktionssammler geführt. Sie wurde auf 0,04 ml/min und ein Gesamtvolumen von 50 ml eingestellt. Der Fraktionssammler sammelte die Eluate in drei 96-Well-Platten („rack number“: 3; „start tube number“: 1; „end tube number“: 288). Die Fraktionen wurden für je 3 min gesammelt („fraction size“), daher enthielten sie rund 120 µl. Sinnvoller Weise wurden nur die Eluate gesammelt, die auch möglicherweise Protein enthielten. Daher wurde erst nach 300 min mit der Sammlung gestartet („time window“: 300-1500 min). Somit lief die präparative Gelelektrophorese insgesamt für rund 19,5 h. Anschließend konnten die Eluate analysiert werden. Durch eine zusätzliche Färbung des PA-Gels mit Coomassie (II7.2.4) wurde die vollständige Elution der Proteine nachgewiesen.

<u>PräpGE-Laufpuffer</u>	384 mM	Glycin
	50 mM	Tris
	0,1% (w/v)	SDS
	1 mM	EDTA

6.5.3 Probenaufbereitung nach der präparativen Gelelektrophorese

Die 288 Eluate einer präparativen Gelelektrophorese wurden auf ihr Proteingehalt hin untersucht. Dieses musste nach jedem Lauf erneut erfolgen, da schon minimale Änderungen in der Durchführung der Elektrophorese zu Verschiebungen der Proteineluatfraktionen führten. In der Regel erfolgte die Auswertung durch SDS-PAGE (II7.2.2). Hierzu wurden jeweils 20 µl der zu untersuchenden Fraktionen aufgetrennt. Zunächst wurde jede 20. Fraktion untersucht, dann wurde die Suche auf einen Bereich von ca. 60 Fraktionen eingegrenzt und hier jede 4.-5. Fraktion getestet. Die Fraktionen, die sauberes markiertes Protein enthielten, wurden anschließend vereinigt. Dies waren in der Regel 20-30 Fraktionen (ca. 2,5-3,5 ml).

Für die weitere Verwendung war die Konzentration des markierten Proteins in den vereinten Fraktionen viel zu gering. Daher wurden sie in 30 kDa-„Amicons“ ca. 50fach aufkonzentriert (II6.10). Die Waschschrte erfolgten mit 1x Solubilisierungspuffer ohne

Saccharose (II6.6.1). Die aufkonzentrierte Probe enthielt somit 0,1% SDS. Anschließend wurde die SDS-Konzentration durch entsprechende Zugabe von 10% SDS auf 2% erhöht. Die so vorbereitete Probe konnte nun direkt in einer Rekonstitution eingesetzt werden (II6.6.1).

6.6 Faltung des LHCII

Der LHCII kann *in vitro* vom denaturierten Apoprotein unter Zugabe von Pigmenten und Detergentien gefaltet werden. Dadurch erhält man den nativ gefalteten und somit funktionellen Pigment-Protein-Komplex als Monomer. Für viele Versuche wurden diese in stabilere Trimere oligomerisiert. Alle pigmenthaltigen Proben wurden dabei möglichst dunkel gehalten.

6.6.1 Detergenz-Wechsel Rekonstitution

LHCII-Monomere wurden mit der sogenannten Detergenz-Wechsel Rekonstitution nach Paulsen et al. (1993) hergestellt. Im Folgenden soll die Methode anhand der Rekonstitution von 250 µg Protein genauer beschrieben werden. Das Protokoll konnte aber auch durch entsprechende Erhöhung aller Mengen für die Rekonstitution von bis zu einigen mg Protein verwendet werden.

Es wurden 250 µg LHCP-IBs mit der Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand verworfen. Das Protein wurde dann in 300 µl 2x Solubilisierungspuffer durch Vortexen und Ultraschall gelöst und anschließend mit 300 µl dH₂O verdünnt. Zur vollständigen Denaturierung des Proteins wurde die Lösung zunächst für 1 min bei 100°C gekocht und nach Abkühlen mit 30 µl 1 M β-ME versetzt. Wenn die Proteinlösung soweit vorbereitet war, wurden 500 µg Totalpigmentextrakt (II6.1) in 60 µl kaltem p.A. Ethanol gelöst. Um auch mögliche Pigmentaggregate zu lösen, wurden sie zusätzlich für 20 sec im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurden die Pigmente unter Vortexen zur Proteinlösung pipettiert und die Mischung für weitere 30 sec gevortext. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 75 µl 10% OG (Octylglucosid) hinzugegeben und die Probe erneut für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde das in der Probe befindliche SDS durch Zugabe von 75 µl 2 M KCl ausgefällt (Detergenz-Wechsel). Nach einer Inkubation von mindestens 15 min auf Eis wurden das ausgefällte SDS und eventuelle Pigmentaggregate durch Zentrifugation für 10 min bei 16000 Upm und 4°C (Hettich Kühlzentrifuge, Rotor 1195) pelletiert. Der Überstand wurde abgehoben, erneut für mindestens 15 min auf Eis inkubiert und wieder zentrifugiert. Der zweite Überstand enthielt nun neben ungebundenen Pigmenten und ungefalteten Proteinen auch LHCII-Monomere. Für eine Verwendung der Monomere

wurden diese anschließend durch Ultrazentrifugation im Saccharosedichtegradienten aufgereinigt (II6.7). Es war auch möglich, die nicht aufgereinigte Monomerlösung für eine Trimerisierung zu verwenden (II6.6.2 und II6.6.3). Hier wurde zusätzlich 2x Solubilisierungspuffer mit Saccharose verwendet, da diese stabilisierend auf die Komplexe wirkt.

Sollten die erhaltenen Monomere mit cysteinreaktiven Farbstoffen markiert werden (II6.3.3), wurde die Protein- und Pigmentmenge verdoppelt und statt des β -ME 5 μ l 100 mM TCyEP (in DMF) je 250 μ g Protein eingesetzt.

<u>2x Solubilisierungspuffer</u>	200 mM	Tris/HCl pH 9,0	
	4% (w/v)	SDS	
	25% (w/v)	Saccharose	(nur bei anschließender Trimerisierung)

6.6.2 Trimerisierung in Liposomen

Alle verwendeten LHCII-Klone konnten durch Integration in Liposomen trimerisiert werden. Da dies aber deutlich länger dauert, als eine Trimerisierung durch Affinitätschromatographie (II6.6.3), wurde die Methode nur für Klone, die keinen „His-Tag“ besaßen, verwendet.

6.6.2.1 Integration von LHCII-Monomeren in Liposomen

Für die Trimerisierung von LHCII-Monomeren muss das Lipid PG (Phosphatidylglucosid) zugegen sein, da dieses der „molekulare Klebstoff“ zwischen den Monomeren ist. Kommen sich dann die Monomere räumlich nahe, trimerisieren sie spontan. Bei der Trimerisierung in Liposomen werden die Monomere in PG-Liposomen integriert. Dafür wird zu den Monomeren, die durch das Detergenz OG in Lösung gehalten werden, eine PG-Lösung gegeben. Durch langsames Entfernen des Detergenz bilden sich PG-Liposomen, in die sich die Monomere integrieren. Dabei können diese auch trimerisieren. Für die Analyse und weitere Verwendung der LHCII-Trimere wurden anschließend die Liposomen durch LM (Laurylmaltosid)-Zugabe zerstört. Im Folgenden wird die Vorgehensweise für die Trimerisierung von 1 mg Protein genauer beschrieben.

1 mg LHCP wurde nach einer standardmäßigen Detergenz-Wechsel Rekonstitution gefaltet (II6.6.1). Parallel hierzu wurde die Liposomenlösung vorbereitet. Dafür wurden 2,5 mg PG (16:0) mit 1 ml Liposomenpuffer versetzt. Die Lipide wurden anschließend mindestens 1 h im warmen Ultraschallbad mit gelegentlichem Vortexen inkubiert und auf diese Weise gelöst. Wenn die Lösung klar war, wurden zusätzlich 100 μ l 10% OG hinzugegeben (Endkonzentration: 1%). Nun wurde die fertige Liposomenlösung unter Vortexen mit dem Rekonstitutionsansatz vermengt und anschließend die Mischung für

weitere 30 sec gevortext. Die Entfernung des OGs aus der Mischung erfolgte mit Hilfe von „BioBeads“ (BioRad, München; II6.6.2.2). Dies sind Polystyrolkügelchen, die Detergenz absorbieren und auf diese Weise der Lösung entziehen. Hierfür wurden zunächst 50 mg nasse „BioBeads“ in den Ansatz gegeben und dieser für 2 h bei 4°C auf dem Drehrad dunkel inkubiert. Dann wurden die „BioBeads“ ausgetauscht. Hierfür wurde der „BioBead“-freie Überstand in ein neues 15 ml-Röhrchen überführt und 100 mg frische, nasse „BioBeads“ hinzugegeben. Nun folgte eine weitere Inkubation für 24 h bei 4°C auf dem Drehrad. Anschließend wurden die „BioBeads“ täglich wie beschrieben ausgetauscht, wobei ansteigende Mengen verwendet wurden. Diese sollten jedoch 50% des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Wenn die Lösung nicht mehr schäumte, wurde die Behandlung beendet. Dies dauerte in der Regel 3-4 Tage.

Die erhaltene LHCII-Liposomen-Lösung konnte „BioBead“-frei in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend für mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden. Zur weiteren Verwendung, z.B. Aufreinigung durch Ultrazentrifugation im Saccharosedichtegradienten (II6.7), wurden sie anschließend schonend auf Eis aufgetaut und die Liposomen durch LM-Zugabe gelöst. Hierfür wurde LM einer Endkonzentration von 0,5% zum Ansatz gegeben und alles anschließend für mindestens 10 min auf Eis inkubiert.

<u>Liposomenpuffer</u>	50 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCl pH 7,5
	0,1 mM	EDTA

6.6.2.2 Umgang mit „BioBeads“

Für die Trimerisierung in Liposomen wurden nur frische, entgaste „BioBeads“ verwendet. Hierfür wurden diese mit Methanol in einen Rundkolben gegeben und beides im Rotationsverdampfer für ca. 20 min entgast. Der Vorgang wurde beendet, sobald sich keine „BioBeads“ mehr an der Oberfläche befanden, sondern alle abgesunken waren. Anschließend wurden die „BioBeads“ abfiltriert und durch Spülen mit ebenfalls entgastem dH₂O komplett von Methanolresten befreit. Anschließend konnten sie in entgastem dH₂O aufgenommen und aufbewahrt werden. Sobald sie wieder an der Oberfläche schwammen, mussten sie erneut entgast werden.

Für die Verwendung der entgasten „BioBeads“ wurde die gewünschte Menge entnommen und überschüssiges dH₂O mit saugfähigem Papier entfernt. Dabei sollten die „BioBeads“ aber nicht austrocknen. So vorbereitet, konnten die „BioBeads“ gewogen und anschließend verwendet werden.

6.6.3 Trimerisierung durch Affinitätschromatographie mit der Ni-Säule

Alle LHCII-Klone, die einen „His-Tag“ besitzen, können durch eine Affinitätschromatographie mit der Ni-Säule trimerisiert werden (Rogl et al., 1998). Als Säulenmaterial wurde hierfür Ni²⁺-IDA-Sepharose („Chalating Fast Flow Sepharose“, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) verwendet. Die Interaktion der Ni-Ionen mit der Sepharose und den Histidinen des Proteins über IDA (Iminodiessigsäure) ist der Interaktion über NTA sehr ähnlich (Abb. 2.6.4). Durch die Bindung auf der Säule kommen sich die LHCII-Monomere räumlich nahe und durch Zugabe von PG können sie anschließend trimerisieren. Bei dem Umgang mit der Ni-Säule, musste darauf geachtet werden, dass alle Ni-haltigen Eluate gesondert entsorgt wurden.

Vorbereitung der Ni-Säule

Die Ni-Säule wurde von Hand vorbereitet. Hierzu wurde je mg Protein 1 ml Säulenmaterial (ohne Ethanol, entspricht 1 Säulenvolumen = 1 SV) in eine leere Chromatographiesäule (Poly-Prep Columns, BioRad, München) gefüllt und nach Abfluss des Ethanols mit 1 SV dH₂O gespült. Die Komplexierung mit Ni²⁺-Ionen erfolgte durch Zugabe von 3 SV 0,3 M NiCl₂. Dabei färbte sich die Säule grün. Durch 3 SV 50 mM Tris/HCl pH 7,5 wurde dann der pH der Säule eingestellt. Dies war durch Blaufärbung zu verfolgen. Anschließend wurde die Säule mit 1 SV OG-Puffer für die anschließende Trimerisierung äquilibriert. Die so vorbereitete Säule wurde für mindestens 15 min bei 4°C gekühlt, bevor sie mit Protein beladen wurde.

Trimerisierung von LHCII

Der LHCII sollte immer dunkel und kühl gelagert werden, daher erfolgte die Trimerisierung bei 4°C. Auf die vorbereitete und gekühlte Ni-Säule konnte die nach einer standardmäßig durchgeführten Detergenz-Wechsel Rekonstitution (II6.6.1) erhaltene Monomerlösung direkt aufgetragen werden. Nun folgte eine 30 minütige Inkubation der unverschlossenen Säule. Anschließend wurden ungebundene Pigmente durch erst 2 SV OG-Puffer und dann 2 SV TX-Puffer von der Säule gewaschen. Die gebundenen Proteine eluierten danach durch Zugabe von 4 SV Elutionspuffer von der Säule. Hier wurde nur das grüne Eluat aufgefangen und weiter verwendet. Darin waren sowohl LHCII-Trimere als auch Monomere enthalten. Diese wurden nachfolgend durch Ultrazentrifugation im Saccharosedichtegradienten aufgetrennt (II6.7).

Regeneration der Ni-Säule

Die Regeneration der Ni-Säule erfolgte in zwei Abschnitten. Zunächst wurde das Säulenmaterial grob vorgereinigt und gesammelt. Anschließend folgte eine ausführliche Regeneration im großen Maßstab.

Die Vorreinigung wurde direkt nach der Elution des LHCII vorgenommen. Sie konnte wieder bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Zunächst wurden Proteinreste durch 4 SV SDS/Imidazol-Puffer und 4 SV dH₂O von der Säule gewaschen. Anschließend wurden die Ni²⁺-Ionen durch 2 SV 0,5 M EDTA und 4 SV dH₂O entfernt. Die Lagerung und Sammlung der Sepharose erfolgte in 20% Ethanol. Daher wurde sie zunächst mit 2 SV 20% Ethanol gespült und konnte anschließend bei 4°C aufbewahrt werden.

Für die ausführliche Regeneration wurde das gesammelte und vorgereinigte Säulenmaterial mit 2 SV dH₂O gewaschen. Anschließend wurden mit 4 SV SDS/Imidazol-Puffer und 4 SV dH₂O restliche Proteine und mit 1 SV 0,5 M EDTA und 2 SV dH₂O restliche Ni²⁺-Ionen entfernt. Eventuelle Pigmentreste wurden nacheinander durch 1 SV 20% Ethanol, 1 SV 60% Ethanol, 1 SV 100% Ethanol, 1 SV 60% Ethanol und schließlich 1 SV 20% Ethanol beseitigt. Auf diese Weise regenerierte Sepharose wurde in 20% Ethanol bei 4°C gelagert und konnte für eine erneute Trimerisierung durch Affinitätschromatographie eingesetzt werden.

<u>OG-Puffer</u>	1% (w/v)	OG
	12,5% (w/v)	Saccharose
	0,1 M	Tris/HCl pH 9,0
<u>TX-Puffer</u>	0,05% (v/v)	Triton X-100
	0,1 M	Tris/HCl pH 7,5
	0,1 mg/ml	PG
<u>Elutionspuffer</u>	0,05% (v/v)	Triton X-100
	10 mM	Tris/HCl pH 7,5
	0,3 M	Imidazol
	0,1 mg/ml	PG
<u>SDS/Imidazol-Puffer</u>	2% (w/v)	SDS
	0,4 M	Imidazol

6.7 Ultrazentrifugation des LHCII im Saccharosedichtegradienten

Die Aufreinigung von rekonstituierten Pigment-Protein-Komplexen erfolgte durch Ultrazentrifugation im Saccharosedichtegradienten. Auf diese Weise konnten ungebundene Pigmente und ungefaltete Proteine entfernt werden. Außerdem war es möglich LHCII-Monomere und -Trimere aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte zu trennen.

Zur Herstellung der Saccharosedichtegradienten wurde Saccharosegradientenpuffer in die Gradientenröhrchen (je 4,5 ml) gefüllt und diese bei -20°C eingefroren. Am Tag des Gebrauchs wurden sie dann langsam bei 4°C aufgetaut. Durch die unterschiedlichen Gefrierpunkte von Wasser und Saccharose entstand auf diese Weise ein linearer Saccharosegradient mit der höchsten Saccharosedichte am Röhrchenboden. Für die

Ultrazentrifugation wurden oben mindestens 200 µl vom Gradienten abgenommen und die entsprechenden Proben vorsichtig aufgetragen. Dabei sollten diese für eine optimale Auftrennung nicht in den Gradienten einsinken. In der Regel wurden 100 µg Monomere oder 250 µg Trimere je Gradient aufgetrennt. Das Gesamtvolumen einer Probe sollte dabei 500 µl nicht übersteigen, da sonst die Trennstrecke zu kurz werden würde. Anschließend wurden die Gradienten inklusive der Gehänge austariert und für 16 h bei 4°C und 54000 Upm (Rotor SW 60 Ti) zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden die Gradienten vorsichtig aus den Gehängen genommen und die grünen Banden photographisch dokumentiert. Anschließend wurden die gewünschten Banden mit einer Kanüle abgezogen. Die LHCII in den so erhaltenen Proben wurden immer durch spektroskopische Methoden (II7.3) auf eine korrekte Faltung überprüft und konnten ansonsten direkt weiter verwendet werden. Monomere waren für einige Tage, Trimere für einige Wochen auf Eis und in Dunkelheit stabil.

<u>Saccharosegradientenpuffer</u>	0,5 M/0,6 M 0,1% (w/v) 5 mM	Saccharose (Monomere/Trimere) LM Tris/HCl pH 7,5
<u>QD-Saccharosegradientenpuffer</u> (auch für aminoreaktive Markierung)	0,6 M 0,1% (w/v) 10 mM	Saccharose LM NaP pH 8,5
<u>Saccharosegradientenpuffer 9,5</u>	0,6 M 0,1% (w/v) 10 mM	Saccharose LM Na-Borat pH 9,5

6.8 Trypsinverdau des LHCII

Die Endopeptidase Trypsin kann bei einem gefalteten LHCII nur die ersten acht Aminosäuren des N-Terminus verdauen (Nußberger et al., 1993, Paulsen et al., 1993). Auf diese Weise können z.B. Farbstoffe, die an diesen Aminosäuren kovalent gebunden sind, vom Komplex abgespalten werden. Der N-terminal verkürzte Komplex bleibt ansonsten intakt. Ein Trypsinverdau wurde in dieser Arbeit für mehrere Fragestellungen verwendet. Zum einen konnte durch den partiellen Verdau die korrekte Faltung der Komplexe getestet werden. Weiterhin war es möglich zu untersuchen, wie viele der kovalent gebundenen Farbstoffe innerhalb der ersten acht Aminosäuren interagierten. Schließlich konnte der Trypsinverdau bei einem einfach N-terminal markierten LHCII verwendet werden, um Donor und Akzeptor zu trennen und auf diese Weise den Energietransfer zu untersuchen.

Trypsin neigt zum Eigenverdau, weshalb es immer frisch angesetzt wurde. Hierfür wurde rund 1 mg Trypsin abgewogen und in Trypsin-Puffer gelöst. Die Endkonzentration betrug

dabei 1 mg/ml. Für den Verdau wurde das gelöste Trypsin mit einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml direkt zum LHCII gegeben und der Ansatz für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Als Kontrolle wurden immer dieselben Mengen LHCII und Trypsinpuffer gemischt und inkubiert.

Sollten die Proben nach dem Verdau durch SDS-PAGE (II7.2.2) analysiert werden, wurde die LHCII-Lösung unverdünnt eingesetzt und anschließend 20 µl der verdauten Probe elektrophoretisch aufgetrennt. Wurde der Trypsinverdau durchgeführt, um den Energietransfer fluoreszenzspektroskopisch zu untersuchen (II7.3.2), wurde der LHCII vor dem Verdau bis zu einer maximalen Konzentration von 37 nM ($A_{670\text{ nm}} \leq 0,02$) verdünnt. Hiervon wurden dann mindestens 300 µl für den Verdau verwendet.

<u>Trypsin-Puffer</u>	10 mM	Tricine/KOH pH 8,0
	0,2 mM	EDTA

6.9 Butanolextraktion nach Martinson & Plumley (1995)

Die im LHCII gebundenen Pigmente können durch eine Butanolextraktion vom Protein getrennt werden. Dadurch war es möglich, sie genauer zu analysieren und die gebundenen Pigmente stöchiometrisch zu berechnen. So konnte untersucht werden, ob die Pigmentbindung bei neuen Klonen oder markierten LHCII gestört wird. Zum Schutz der Pigmente erfolgte die Extraktion möglichst dunkel und schnell.

In der Regel wurden 50 µl LHCII mit 50 µl dH₂O gemischt. Dieses Verhältnis konnte jedoch je nach Konzentration des LHCII variiert werden. Dabei sollte allerdings das Gesamtvolumen immer 100 µl betragen. Zu dieser Mischung wurden 66 µl 2-Butanol gegeben und alles durch Vortexen gut gemischt. Anschließend wurde die wässrige Phase durch 33 µl 5 M NaCl polarer gemacht und auf diese Weise die Phasentrennung optimiert. Nach erneutem Vortexen wurde die Probe für 1 min bei 14000 Upm (Hettich Tischzentrifuge) zentrifugiert. Nun konnte die obere, pigmenthaltige Butanolphase in ein vorgewogenes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt werden. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die proteinhaltige Interphase nicht berührt wurde. Sollte die Extraktion quantitativ erfolgen, wurde die verbliebene wässrige Phase erneut mit Butanol und NaCl versetzt und zentrifugiert. Die so erhaltene zweite Butanolphase wurde zur ersten pipettiert. Anschließend wurde das Volumen des Butanols gravimetrisch anhand folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Gewicht}}{0,81} = \text{Volumen (Butanol)}$$

Zur Analyse der extrahierten Pigmente wurden diese mit dem zweifachen Volumen an 70% Aceton versetzt. So vorbereitet konnten sie direkt mit der HPLC (II7.1.1) untersucht werden.

6.10 Aufkonzentrierung und Pufferwechsel

In manchen Versuchen wurde eine höhere LHCII-Konzentration benötigt, als nach der Ultrazentrifugation im Saccharosedichtegradienten vorhanden war. Außerdem musste manchmal die Saccharose aus diesen Proben entfernt werden. In beiden Fällen wurden „Amicon Ultra MW 30“ Zentrifugalfiltereinheiten (Millipore, Cork, Irland) verwendet. Diese besitzen eine Polycarbonatmembran, welche Moleküle bis zu einer Größe von 30 kDa passieren lässt. Dadurch können Pufferkomponenten wie Salze und Zuckermoleküle aus der LHCII-Lösung entfernt werden. Letzterer bleibt dagegen auch als Monomer aufgrund seiner Detergenzhülle zurück. Detergentien können die Membran nur passieren, wenn sie sich unterhalb ihrer kritischen Mizellenkonzentration befinden. Dann liegen sie als einzelne Moleküle vor und sind damit kleiner als 30 kDa. Oberhalb der kritischen Mizellenkonzentration bilden sie Mizellen und werden zusammen mit dem Protein aufkonzentriert.

Vor dem Gebrauch wurden die Zentrifugaleinheiten einmal mit dH₂O gefüllt und für 10 min bei 4°C und 6000 Upm (Hettich Kühltzentrifuge, Rotor 1015) zentrifugiert. Anschließend konnten maximal 3 ml Probe bis zu einem Endvolumen von 50 µl aufkonzentriert werden. Dabei wurde mehrfach wie oben zentrifugiert, und die Probe zwischen den Zentrifugationen resuspendiert, um eine mögliche Aggregation des Proteins an der Membran zu verhindern. Bei einem gewünschten Pufferwechsel wurde die aufkonzentrierte Probe mit dem neuen Puffer wieder auf das Ausgangsvolumen verdünnt und erneut aufkonzentriert. Dieser Schritt wurde drei bis fünf Mal wiederholt. Benutzte Zentrifugaleinheiten wurden zunächst durch Inkubation in Waschlösung über Nacht von Proteinresten befreit und anschließend in 20% Ethanol bei 4°C gelagert. Auf diese Weise konnten sie mehrere Male verwendet werden. Es war jedoch darauf zu achten, dass sie nie austrockneten.

Waschlösung

0,1% (w/v)	SDS
10 mM	Tris/HCl pH 7,5

6.11 Interaktion von LHCII mit TiO₂-Platten

Für die mögliche Nutzung von LHCII als Lichtantenne in DSSCs wurde die Interaktion mit TiO₂-Platten in Abhängigkeit von der Anwesenheit des Farbstoffs TMIMA untersucht. Die hierbei verwendeten TiO₂-Platten wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus Müllen am

Max-Planck-Institut für Polymerforschung hergestellt. Sie bestanden aus einer Glasplatte mit einer Fläche von 2,5 cm x 2,5 cm. Diese war mit Fluor dotiertem Zinndioxid (FTO, „fluorine doped tin dioxide“) und TiO_2 beschichtet. Einige Platten besaßen zusätzlich eine Schicht aus TMIMA.

Zur Belegung dieser Platten mit LHCII wurden Komplexe verwendet, die durch Ultrazentrifugation im Saccharosedichtegradienten (II6.7) aufgereinigt worden waren und anschließend direkt verwendet wurden. Je 200 μl dieser LHCII wurden so auf die Platten pipettiert, dass die Lösung nicht von der Platte lief. In der Regel wurden dabei 0,625 nmol LHCII eingesetzt, dies entsprach 0,1 nmol LHCII je cm^2 . Wurden TMIMA-belegte TiO_2 -Platten untersucht, wurde zum LHCII zusätzlich ein 15fach molarer Überschuss an TCyEP gegeben ($\sim 9,5$ nmol). Dieses sollte die im LHCII vorhandenen Cysteine reduzieren, damit sie mit der Maleimidgruppe vom TMIMA interagieren konnten. Die Inkubation erfolgte bei 10°C und Dunkelheit für mindestens 16 h. Anschließend wurde die LHCII-Lösung so gut wie möglich abpipettiert und aufbewahrt. Zum Waschen der Platten wurden 500 μl Saccharosegradientenpuffer (II6.7) auf die Platte gegeben und für 5 min inkubiert. Dann wurde dieser wieder abgenommen und mit der aufbewahrten LHCII-Lösung vereint. Die Analyse der Interaktion erfolgte durch spektroskopische Methoden. Hierfür wurden zunächst die im Überstand befindlichen Komplexe photometrisch bestimmt (II7.3.1) und auf diese Weise die Menge der gebundenen LHCII berechnet. Zusätzlich wurden die belegten TiO_2 -Platten mit der „Front face“-Anordnung fluoreszenzspektroskopisch untersucht (II7.3.2).

6.12 Versuche zur Bindung von QDs und LHCII

Neben Hybridkomplexen mit Farbstoffen standen Hybridkomplexe aus QDs und LHCII im zentralen Fokus dieser Arbeit. Dabei wurden die Natur ihrer Interaktion und der Energietransfer zwischen beiden Komponenten untersucht.

6.12.1 Herstellung von QD-Protein-Hybridkomplexen

Die untersuchten QD-LHCII-Hybridkomplexe wurden alle durch spontane Interaktion beider Komponenten hergestellt. Hierfür wurde der LHCII standardmäßig rekonstituiert und trimerisiert (II6.6) und durch Ultrazentrifugation im Saccharosedichtegradienten mit QD-Saccharosegradientenpuffer (II6.7) aufgereinigt. Anschließend wurden die gewünschten molaren Verhältnisse von LHCII und QD in demselben Puffer gemischt und für 90 min dunkel auf Eis inkubiert. Die so erhaltenen Komplexe wurden durch UV-Vis- (II7.3.1) und Fluoreszenzspektroskopie (II7.3.2) analysiert.

In einigen Versuchen wurden zur Kontrolle Hybridkomplexe aus QDs und unpigmentiertem WSCP („Water-soluble chlorophyll protein“) hergestellt. Hierfür wurde das WSCP, wie von Häcker (2009) beschrieben, rekombinant hergestellt und anschließend über eine Affinitätschromatographie mittels Ni-Säule aufgereinigt. Die Herstellung der Hybridkomplexe erfolgte analog zu den QD-LHCII-Hybridkomplexen.

6.12.2 Auftrennung von QD-LHCII-Hybridkomplexen durch Ultrazentrifugation

Die Auftrennung von QD-LHCII-Hybridkomplexen durch Ultrazentrifugation wurde benutzt, um die Interaktion beider Komponenten näher zu untersuchen. Durch die unterschiedliche Dichte von QDs und LHCII war es mit dieser Methode möglich, nicht gebundenen von QD-gebundenen LHCII zu trennen und somit Aussagen bezüglich der Bindungseigenschaften bei verschiedenen Bedingungen zu treffen. Die Auftrennung wurde mit der Airfuge durchgeführt und während der Arbeit optimiert (vgl. III6.2.1). Im Folgenden soll das letztendliche Protokoll genauer dargestellt werden.

Für die Auftrennung durch Ultrazentrifugation wurden die gewünschten QD-LHCII-Verhältnisse mit QD-Saccharosegradientenpuffer (II6.7) in einem Endvolumen von 30-50 µl zusammenpipettiert, durch Anschnipsen gemischt und für 90 min auf Eis dunkel inkubiert. Sollten nach der Auftrennung die LHCII-Konzentrationen der verschiedenen Proben photometrisch bestimmt werden, wurden dabei 20 pmol LHCII eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die Proben auf frische Saccharosekissen pipettiert. Diese bestanden aus 50 µl Airfugepuffer mit 2 M Saccharose und entsprechend des Probenvolumens aus 80-100 µl Airfugepuffer mit 1 M Saccharose. Damit wurde das mögliche Maximalvolumen in der Airfuge von 180 µl (Rotor A110) voll ausgeschöpft. So vorbereitet, wurden die Proben für 20 min bei 105000 Upm zentrifugiert. In der Regel pelletierten dabei die QDs und mit ihnen die QD-gebundenen LHCII. Die freien LHCII blieben dagegen im oberen Teil des Saccharosekissens. Diese wurden zusammen mit dem Überstand abgehoben und aufbewahrt. Das Pellet wurden mit 100 µl vorgekühltem QD-Saccharosegradienten versetzt, durch Ultraschallbehandlung gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Röhrchen noch einmal mit weiteren 100 µl QD-Saccharosepuffer gespült und dieser zum resuspendierten Pellet gegeben. Beide Proben (Überstand + Pellet) wurden nun jeweils auf 500 µl mit QD-Saccharosegradientenpuffer aufgefüllt und spektroskopisch analysiert (II7.3).

<u>Airfugepuffer</u>	1 oder 2 M	Saccharose
	10 mM	NaP pH 8,5
	0,1% (w/v)	LM

7 Analytische biochemische Methoden

Die analytischen biochemischen Methoden dieser Arbeit umfassten Untersuchungen der gebildeten Hybridkomplexe mit Hilfe von Chromatographien, Gelelektrophoresen sowie diversen Spektroskopien. Außerdem wurden die erhaltenen Daten rechnerisch analysiert.

7.1 Analytische Chromatographien

Durch Chromatographien können Stoffgemische in ihre einzelnen Komponenten getrennt und somit auf ihre Zusammensetzung geprüft werden. In dieser Arbeit wurde das Prinzip für die Trennung von Pigmentgemischen und Proteinpopulationen verwendet.

7.1.1 Analytische HPLC zur Charakterisierung von Pigmentgemischen

Nach der Isolation von Totalpigmentextrakt (II6.1) oder einer Butanolextraktion (II6.9), wurden die Pigmentgemische mit einer HPLC („High performance liquid chromatography“) analysiert. Hierbei wurden je 20 µl Pigmente in 80% Aceton auf eine „Reversed-Phase“-C18-Säule aufgetragen und anschließend durch einen Acetongradienten von 70-100% (Programm „ChromalithA“, Dauer 6,5 min) aufgetrennt. Hierbei eluieren hydrophile vor hydrophoben Pigmenten. Dabei wurde das Eluat kontinuierlich photometrisch analysiert, wodurch die Qualität und der Derivatzustand der einzelnen Pigmente untersucht werden konnte. Zusätzlich wurde die Menge der jeweiligen Pigmente durch Integration der Elutionspeaks bei 440 nm bestimmt. Nach einem HPLC-Lauf wurde die Probenschleife mit 80% Aceton gespült und die Säule durch zwei Leerläufe von eventuellen Pigmentresten befreit.

7.1.2 FPLC zur Trennung von verschiedenen Proteinpopulationen

Die Trennung von verschiedenen Proteinpopulationen kann mit einem FPLC („Fast protein liquid chromatography“)-System durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde damit versucht, PDI-Mal markierten und unmarkierten LHCP voneinander zu trennen. Dafür wurde eine Anionenaustauscher-Chromatographie durchgeführt, bei der das markierte LHCP aufgrund der vier negativen Ladungen von PDI-Mal später eluieren sollte als das unmarkierte LHCP. Beide Populationen hätten anschließend weiter verwendet werden können, jedoch wurde die Methode in dieser Arbeit nur analytisch verwendet.

Für die Durchführung der FPLC mussten alle verwendeten Puffer filtriert und entgast werden. Im Laufe der Arbeit wurde die Zusammensetzung der Puffer optimiert. Dabei wurde vor allem das Ziel verfolgt, die Löslichkeit des LHCP im Puffer zu verbessern. Außerdem

kamen zwei verschiedene Anionenaustauscher-Säulen (II1) zum Einsatz. Neben einer erhofften, besseren Auftrennung mit der neuen Poros HQ-Säule, konnte hier auch eine höhere Fließgeschwindigkeit verwendet werden.

Tabelle II.14 Verwendetes FPLC-Programm.

Volumen	Gradient
10 ml	100% Puffer A
20 ml	Linearer Gradient von A nach B
5 ml	100% Puffer B
10 ml	Linearer Gradient von B nach A
5 ml	100% Puffer A

Für die Trennung eines Proteingemisches wurden 150-300 µg LHCP in 2 ml Puffer A gelöst, dem 5 mM β -ME zugesetzt waren. Um möglicherweise vorhandene Proteinaggregate vor dem Säulenauftrag zu entfernen, wurde die Lösung zentrifugiert und nur der Überstand verwendet. Die Elution der Proteine erfolgte anhand des in Tabelle II.14 dargestellten Programms. Die Fließgeschwindigkeit betrug dabei 0,5 (Mono Q) bzw. 1,0 ml/min (Poros HQ). Dabei verdrängen die in Puffer B vorhandenen Cl^- -Ionen die negativen Ladungen der Proteine, wodurch letztere dann eluieren. Diese wurden in Fraktionsgrößen von 500 µl aufgefangen und konnten anschließend analysiert werden. Zusätzlich wurde die Absorption aller Eluate bei 280 nm aufgenommen und mit einem Schreiber dokumentiert, bzw. 436 nm sobald Thioharnstoff in den Puffern war.

<u>Puffer A</u>	8 M	Harnstoff	
	20 mM	„Puffer“	
<i>Verwendete Puffer</i>		pH 6,0	Bis-Tris
		pH 7,0	Bis-Tris-Propan
		pH 8,0	Tris
<i>Zusätze für verbesserte LHCP-Löslichkeit</i>			
	2 M	Thioharnstoff	
	4% (w/v)	CHAPS	
<u>Puffer B</u>	wie Puffer A		
	+ 1 M	NaCl	

7.2 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE)

In einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) können Proteine und -gemische aufgetrennt werden. Sie zeigen dabei in Abhängigkeit ihrer Größe und Ladung ein unterschiedliches Laufverhalten und können so qualitativ analysiert werden. Die Größenabhängigkeit wird durch die Porengröße der verwendeten Polyacrylamid-Gele (PA-

Gele) beeinflusst. Dabei gilt, je geringer der Gehalt und die Vernetzung des Acrylamids, desto geringer der Einfluss der Proteingröße auf das Laufverhalten. Die Ladung der Proteine ist dagegen aufgrund der angelegten Spannung wichtig. Diese bewirkt erst die Auftrennung der Proben im Gel. Bei denaturierenden Gelen spielt sie allerdings nur eine untergeordnete Rolle. Hier werden die Proteine zunächst in SDS denaturiert. Dadurch werden die Eigenladungen der Proteine maskiert und alle Proteine sind aufgrund der angelagerten Dodecylsulfat-Ionen negativ geladen.

7.2.1 Gießen der PA-Gele

Alle verwendeten PA-Gele wurden selbst hergestellt. Dies geschah unter dem Abzug und mit Schutzkleidung wegen der Toxizität einiger Zutaten. Es wurden dabei verschiedene Systeme verwendet, die alle unterschiedliche Puffer- bzw. Gelkomponenten aufwiesen. Diese sollen daher nachfolgend getrennt dargestellt werden.

7.2.1.1 PA-Gele nach Lämmli (1970)

Im „Lämmli-System“ besitzen die PA-Gele neben dem eigentlichen Trenngel ein sogenanntes weitporiges Sammelgel. Dieses müssen die Proteinproben zuerst durchlaufen. Dabei sammeln sie sich auf engem Raum, wodurch sie das Trenngel alle gleichzeitig erreichen. Hiermit werden Auftrags-bedingte Unterschiede der Trennstrecke aufgehoben. Der Sammeleffekt kommt durch den pH des Gels zustande. Bei pH 6,8 ist Glycin ein Zwitterion und läuft somit langsamer als die Proteine und das sogenannte Leitton Chlorid. Dadurch entsteht ein elektrischer Feldgradient, in dem langsame Protein beschleunigt werden und zu schnelleren aufschließen.

Zum Gießen der Gele wurde eine Gelkammer verwendet, in der bis zu zehn 0,75 mm dicke Gele gleichzeitig hergestellt werden konnten. Hierfür wurde sie immer abwechselnd mit einer Aluminiumoxidplatte, zwei „Spacern“ und einer Glasplatte gefüllt. Alle beteiligten Komponenten mussten dabei frei von Schmutz, Gel- oder Fettresten sein. Sobald die Gelkammer fertig zusammengebaut war, wurden die Lösungen für das Trenngel gemischt (Tabelle II.15) und anschließend mit der Wasserstrahlpumpe entgast. Nun konnte die Polymerisation durch APS- und TEMED-Zugabe gestartet und die Mischung rasch in die Gelkammer gegossen werden. Die Füllhöhe entsprach dabei ungefähr $\frac{3}{4}$ der maximalen Höhe. Zum optimalen Auspolymerisieren wurde nun jedes Gel mit 400 μl dH_2O überschichtet. Nach 1 h wurde das Wasser mit Filterpapier entfernt. Dann wurde das Sammelgel analog zum Trenngel vorbereitet (Tabelle II.15) und bis zum oberen Rand in die Gelkammer gegossen. Der Luftabschluss erfolgte diesmal durch die anschließend eingesetzten Probenkämme. Diese bildeten zusätzlich 10 Taschen für den späteren

Probenauftrag. Nach einer weiteren Stunde war auch das Sammelgel auspolymerisiert und die Gele konnten aus der Gelkammer genommen, von den Kämmen befreit, mit dH₂O gespült und in Klarsichtfolie gewickelt für einige Wochen bei 4°C gelagert werden.

Tabelle II.15 Zusammensetzung der PA-Gele nach Lämmli (1970).

	Trenngel		Sammelgel
	10%	15%	4%
30% Acrylamid / 1% Bisacrylamid	18 ml	27,4 ml	6 ml
1 M Tris/HCl pH 8,8	22,6 ml	22,6 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	5,2 ml
80% Glycerin (v/v)	3,4 ml	3,4 ml	5 ml
dH₂O	11,2 ml	1,8 ml	23,4 ml
10% APS	400 µl	400 µl	200 µl
TEMED	26 µl	26 µl	20 µl

7.2.1.2 PA-Gele nach Schägger & von Jagow (1987)

Im Gegensatz zu „Lämmli-PA-Gelen“ besitzen PA-Gele nach Schägger und von Jagow zusätzlich noch ein „Spacergel“ (Tabelle II.16). Dieses führt zusammen mit einer veränderten Zusammensetzung der jeweiligen Gele zu einer optimierten Auftrennung von kleinen Proteinen im Bereich von 5 – 30 kDa. In dieser Arbeit wurden auch Harnstoff-haltige „Schägger-PA-Gele“ verwendet, um damit ein verändertes Laufverhalten der Proben zu erhalten.

Die Gele wurden nach demselben Prinzip hergestellt, wie die „Lämmli-PA-Gele“. Hierbei wurden jedoch die Puffer nicht entgast, da sie SDS enthielten. Zusätzlich wurde auf das zuerst gegossene Trenngel statt des Wassers je 450 µl des Spacergels pipettiert und beides ohne weitere Zugabe auspolymerisiert. Nach einstündiger Inkubation wurde das Sammelgel hinzugegeben und dieses mit Probenkämmen abgeschlossen. Nach dem Auspolymerisieren und Auspacken, konnten auch diese Gele in Klarsichtfolie für einige Wochen bei 4°C gelagert werden.

Lösung 1

40% Acrylamid (Acrylamid-Bisacrylamid 29,1:0,9)

Lösung 2

40% Acrylamid (Acrylamid-Bisacrylamid 19:1)

Tris-SDS-Puffer

3 M Tris
0,3% (w/v) SDS
Mit HCl auf pH 8,45 einstellen.

Tabelle II.16 Zusammensetzung der PA-Gele nach Schägger und von Jagow (1987).

	Trenngel		Spacergel	Sammelgel
	10%	16%	6%	4%
Lösung 1	6,0 ml	-	1,0 ml	2,0 ml
Lösung 2	-	9,9 ml		
Tris-SDS-Puffer	8,0 ml	8,0 ml	1,33 ml	5,0 ml
80% Glycerin (v/v)	3,0 ml	3,0 ml	-	-
Harnstoff (bei Bedarf)	8,8 g	8,8 g	-	-
dH₂O	auf 24 ml auffüllen	auf 24 ml auffüllen	4,17 ml	13,0 ml
10% APS	8 µl	8 µl	2 µl	15 µl
TEMED	80 µl	80 µl	20 µl	150 µl

7.2.1.3 PA-Gradientengele nach Fling & Gregerson (1986)

Zu besseren Trennung von PDI-Mal markiertem und unmarkiertem LHCP wurden diese in Gradientengelen nach Fling und Gregerson aufgetrennt. Das Trenngel dieser Gele enthält dabei einen Acrylamidgradienten, der in der vorliegenden Arbeit zwischen 15 und 21% lag. Um eine möglichst lange Trennstrecke für die Proteine zu gewährleisten, wurden zusätzlich größere Gele (18 cm x 16 cm) verwendet. Diese wurden immer einzeln gegossen. Dabei wurden zunächst die beiden Trenngelpuffer hergestellt (Tabelle II.17). Diese wurden nicht entgast, da sie SDS enthielten. Die Herstellung des Gradienten erfolgte mit einem Gradientenmischer. Hierzu wurde die Trenngellösung 2 (21% Acrylamid) in die vordere Kammer des Gradientenmischers gegeben. Diese enthielt zusätzlich einen Rührfisch. Nachdem der Durchfluss zur hinteren Kammer mit der Trenngellösung 2 gefüllt war, wurde das Ventil geschlossen und hinüber geflossene Lösung wieder in die vordere Kammer gefüllt. Nun wurde die Trenngellösung 1 in die hintere Kammer gegeben. Anschließend konnte das Trenngel gegossen werden. Hierfür wurde zunächst das Ventil zwischen den beiden Kammern geschlossen gehalten. Erst wenn der Boden des Gels komplett mit Trenngellösung 2 bedeckt war, wurde das Ventil geöffnet und somit der Gradient produziert. Das fertige Trenngel wurde mit dH₂O bedeckt und für mindestens 2 h auspolymerisiert. Anschließend wurde das Wasser mit Filterpapier entfernt, das Sammelgel zusammenpipettiert und auf das Trenngel gegeben. Als Luftabschluss wurde ein Kamm für 18 Probestaschen verwendet. Die anschließende Polymerisation dauert auch mindestens 2 h. Nun mussten nur noch der Kamm und die Klammern entfernt werden, um das Gel zu verwenden. Hierbei musste allerdings darauf geachtet werden, dass die beiden Glasplatten zusammengedrückt wurden, um ein kurzfristiges Öffnen der Gelkassette zu verhindern.

Durch das Öffnen hätten Luftblasen produziert werden können, die eine optimale Auftrennung verhindert hätten.

Tabelle II.17 Zusammensetzung der PA-Gradientengele.

	Trenngel 1 (15 ml)		Trenngel 2 (15 ml)		Sammelgel (15 ml)	
	Volumen	Endkonz.	Volumen	Endkonz.	Volumen	Endkonz.
30% Acrylamid / 1% Bisacrylamid	7,5 ml	15%	10,5 ml	21%	2,5 ml	5%
3 M Tris/HCl pH 8,8	3,75 ml	0,75 M	3,75 ml	0,75 M	-	-
3 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	-	-	1,875 ml	0,125 M
10% SDS (w/v)	150 µl	0,1%	150 µl	0,1%	150 µl	0,1%
dH₂O	3,6 ml	-	600 µl	-	10,45 ml	-
10% APS	15 µl	0,01%	15 µl	0,01%	75 µl	0,05%
TEMED	7,5 µl	0,05%	15 µl	0,1%	7,5 µl	0,05%

7.2.2 Denaturierende SDS-PAGE

Eine denaturierende SDS-PAGE konnte mit allen beschriebenen PA-Gelsystemen durchgeführt werden. Allerdings wurde standardmäßig, wenn nicht anders vermerkt, das „Lämmli“-System mit 15% PA-Gelen verwendet. Bei einer denaturierenden SDS-PAGE werden die Proteine nur nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, die Ladung spielt aufgrund des angelagerten SDS keine Rolle mehr. Es wurden immer 0,5 – 2 µg Protein mit ¼-½ Volumen Sparmix versetzt und diese Proben anschließend zum vollständigen Denaturieren für 1 min bei 100°C gekocht. Nach dem Abkühlen der Proben wurden sie kurz anzentrifugiert und konnten anschließend mit einer ausgezogenen Pipettenspitze aufgetragen werden. Als Proteinstandard wurde meistens der „SDS 7-Marker“ (II2.2) verwendet, sollten die Proteine jedoch für eine optimale Auftrennung bis ins untere Gelviertel laufen, wurde der „Page Ruler Prestained“ benutzt (II2.2). Die anschließende Elektrophorese erfolgte mit den in Tabelle II.18 angegebenen Laufparametern. Nach Beendigung der Auftrennung wurden die Gele aus den Gelkassetten heraus geholt. Eine mögliche Fluoreszenz der Banden konnte dann mit der VersaDoc (II7.2.5) detektiert werden, ansonsten wurden die Proteine durch Coomassiefärbung (II7.2.4) sichtbar gemacht.

Tabelle II.18 Laufparameter für denaturierende SDS-PAGE verschiedener Gelsysteme.

Gelsystem	Laufpuffer	Stromstärke	Spannung	Dauer
Lämmli	SDS-Laufpuffer	max. 400 mA	80-150 V	~ 1 h
Schägger	Anoden-/Kathoden-Puffer	max. 400 mA	40-200 V	~ 1 h
Gradientengel	Gradienten-Laufpuffer	15-20 mA	max. 300 V	~ 50 h

<u>Sparmix</u>	100 mM	Tris/HCl pH 6,8
	1,4 M	β-ME
	4% (w/v)	SDS
	24% (v/v)	Glycerin
	0,4 mM	Bromphenolblau
<u>SDS-Laufpuffer</u>	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,1% (w/v)	SDS
	0,5 mM	EDTA
<u>Anoden-Puffer</u>	200 mM	Tris
	Mit HCl pH auf 8,9 einstellen.	
<u>Kathoden-Puffer</u>	100 mM	Tris
	100 mM	Tricine
	0,1% (w/v)	SDS
<u>Gradienten-Laufpuffer</u>	50 mM	Tris
	190 mM	Glycin
	0,1% (w/v)	SDS

7.2.3 Schwach denaturierende PAGE nach Peter & Thornber, 1991 („grüne“ PAGE)

Bei einer schwach denaturierenden PAGE behalten die Proteine zumeist ihre native Struktur. Dadurch werden sie zusätzlich in Abhängigkeit ihrer Ladungen aufgetrennt und ein Vergleich mit einem allgemeinen Proteinstandard ist nicht möglich. Allerdings können hiermit Oligomerisierungszustände von Proteinen untersucht werden, da diese erhalten bleiben. In dieser Arbeit wurde die „grüne“ PAGE verwendet, um die Rekonstitution von LHCII zu überprüfen. Dabei war es auch möglich, Monomere von Trimeren zu unterscheiden und durch die grüne Farbe der Komplexe konnten die gestellten Fragen häufig schon ohne eine weitere Färbung der Proteine beantwortet werden.

Für eine gute Auftrennung von Mono- und Trimeren wurden immer 10% „Lämmli-PA-Gele“ verwendet. Zusätzlich wurden die Proben nicht mit Sparmix gemischt, sondern 1/10 Volumen 80% (v/v) Glycerin zugegeben. Dadurch wurden die Proben beschwert und liefen beim Probenauftrag in die Taschen. Die Gelelektrophorese konnte mit zwei verschiedenen Laufpuffern durchgeführt werden. Deriphatpuffer ist für die Komplexe schonender als LDS-Puffer. Letzterer ist aber einfacher herzustellen (vgl. Dockter 2009) und wurde daher immer verwendet, wenn nur eine qualitative Aussage getroffen werden musste. Nach dem Probenauftrag wurde das Gel zunächst bei 40 V gestartet. Waren alle Proben bis ins Trenngel gewandert, wurde die Spannung auf 80 V erhöht. Höhere Spannungen wurden nicht angelegt, damit die Komplexe nicht denaturierten. Zusätzlich wurden die Gele während der Auftrennung abgedunkelt und gekühlt. Nach Beendigung der PAGE wurden die Gele zunächst photographisch dokumentiert und anschließend mit Coomassie gefärbt (II7.2.4).

<u>Deriphat-Puffer</u>	0,15% (w/v)	Deriphat
	48 mM	Glycin
	12 mM	Tris
<u>LDS-Puffer</u>	0,1% (w/v)	LDS
	192 mM	Glycin
	25 mM	Tris
	0,5 mM	EDTA

7.2.4 Coomassiefärbung der aufgetrennten Proteine

Nach einer PAGE konnten die aufgetrennten Proteine durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht werden. Dabei bildet der Farbstoff mit unpolaren, kationischen und hydrophoben Proteinbereichen Komplexe und zeigt dadurch mit seiner blauen Farbe ihre Lage an. Hierfür wurden die PA-Gele zunächst von den Glas- und Aluminiumplatten befreit und das Sammelgel abgeschnitten und entsorgt. Die Färbung erfolgte für mindestens 20 min mit Coomassielösung, anschließend konnten die Gele im 1. Entfärber grob gewaschen werden. Hier sollten sie aber nur maximal 20 min inkubiert werden. Die komplette Entfernung von überschüssigem Coomassie erfolgte im 2. Entfärber. Hier fand die Inkubation solange statt, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Anschließend wurden die Gele mit dH₂O gewässert, bis sie keinen Essiggeruch mehr aufwiesen.

Bei einer nach Schägger und von Jagow durchgeführten PAGE (II7.2.1.2) wurden die Gele vor der Färbung zunächst für 15 min in Schägger-Fixierlösung inkubiert. Die anschließende Färbung und Entfärbung erfolgte dann nach dem oben beschriebenen Protokoll. Allerdings wurde dabei immer der 1. Entfärber weggelassen.

Die gefärbten und gewässerten PA-Gele wurden photographisch dokumentiert und konnten anschließend in Einmachfolie auf dem Gelrockner getrocknet werden.

<u>Coomassielösung</u>	0,2% (w/v)	Coomassie Brilliant Blau
	50% (v/v)	Ethanol
	7% (v/v)	Essigsäure
<u>1. Entfärber</u>	20% (v/v)	Ethanol
	7% (v/v)	Essigsäure
<u>2. Entfärber</u>	10% (v/v)	Essigsäure
<u>Schägger-Fixierlösung</u>	50% (v/v)	Ethanol
	10% (v/v)	Essigsäure

7.2.5 Densitometrische Analysen mit der VersaDoc

Mit Hilfe der VersaDoc konnten diverse Signale detektiert und ausgewertet werden. Hierzu zählten Proteinbanden, die aufgrund von kovalent gebundenen Farbstoffen fluoreszierten oder mit Coomassie gefärbt (II7.2.4) wurden, und mit Ethidiumbromid gefärbte DNA-Proben in Agarosegelen (II5.9). Zusätzlich war es möglich, mit der VersaDoc die Intensitäten der erhaltenen Signale densitometrisch auszuwerten und auf diese Weise Aussagen über ihre jeweiligen Mengen zu treffen.

Für die Fluoreszenzaufnahmen in der VersaDoc wurden die ungefärbten PA-Gele direkt nach der Gelelektrophorese verwendet. Durch die Auswahl entsprechender Filter wurde der Wellenlängenbereich eingeschränkt, in dem die Fluoreszenz detektiert werden sollte. Für die Detektion wurde die Blende komplett geöffnet. Ansonsten wurden die in Tabelle II.19 dargestellten Parameter verwendet.

Tabelle II.19 Verwendete VersaDoc-Einstellungen.

„Donor“ steht für die Detektion der in Bezug auf LHCII verwendeten Donorfarbstoffe (alle PDI, alle Rho, Bodipy), „Nur Bodipy“ für eine spezifische Bodipy-Detektion, bei der gleichzeitig vorhandene PDIs nicht detektiert wurden. „Akzeptor“ steht für die Detektion der in Bezug auf LHCII verwendeten Akzeptorfarbstoffe (alle Terrylene, DNQDI, DY731), „EtBr“ wurde verwendet, um Ethidiumbromid gefärbte DNA zu detektieren.

	Donor	Nur Bodipy	Akzeptor	EtBr	Foto
Filter	520LP	530DF70	610LP	520LP	<i>ohne</i>
Belichtung	UV EPI	UV EPI	UV EPI	UV TRANS	White EPI
Dauer	30-60 sec	30-60 sec	30-60 sec	30-60 sec	4-10 sec
Verstärkung (gain)	4x	4x	4x	4x	1x
Auflösung (bin)	1x1	4x4	1x1	1x1	1x1
Extras	-	-	Ohne Filter 660EFSP	-	„White Screen“

7.3 Spektroskopische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Pigment-Protein-Komplexen, Fluoreszenzfarbstoffen und QDs gearbeitet. Alle diese Stoffe absorbieren Licht und können die dabei aufgenommene Energie teilweise durch Fluoreszenz abgeben. Dadurch konnten viele analytische Fragestellungen mit spektroskopischen Methoden geklärt werden. Hierzu zählte die UV-Vis Photometrie, die Fluoreszenzspektroskopie und die „Circular Dichroism“ (CD)-Spektroskopie. Letztere diente der Analyse von in Pigment-Protein-Komplexen excitonisch gekoppelten Pigmenten.

7.3.1 UV-Vis Photometrie

Bei der UV-Vis Photometrie wird die Lichtabsorption der Proben gemessen. Auf diese Weise kann bei Kenntnis der Absorptionseigenschaften der Stoffe deren Vorhandensein in der Probe bestätigt werden. Hierbei wurden vorwiegend Spektren über den gesamten sichtbaren Bereich (400-750 nm) gemessen. Die Messungen konnten aber auch bis in den UV- (bis 250 nm), bzw. NIR-Bereich (bis 850 nm) ausgedehnt werden. Dabei wurde ein Zwei-Strahl-Photometer verwendet, bei dem automatisch die Absorption des in der zweiten Küvette befindlichen Puffers vom Probenspektrum abgezogen wurde. Auf diese Weise wurde nur die Absorption der relevanten Proben aufgenommen. Zusätzlich wurde vor jeder Messreihe ein Lampenspektrum aufgenommen, welches auch automatisch in den weiteren Messungen abgezogen wurde.

Bei der UV-Vis Photometrie musste darauf geachtet werden, dass die Signalstärke optimal ist. Bei einem zu schwachen Signal ist das Signal-Rausch-Verhältnis ungünstig und das Spektrum kaum aussagefähig, auf der anderen Seite kann das Photometer bei einer Absorption über 1 geringe Unterschiede kaum noch detektieren, wodurch auch dann die Aussagekraft der Spektren nachlässt. Um für eine große Spannbreite an Probenkonzentrationen ein optimales Spektrum messen zu können, kamen daher verschiedene Küvetten zum Einsatz. Diese wiesen sowohl Unterschiede in der Schichtdicke als auch in der Breite des Strahlengangs auf. Zusätzlich mussten für Messungen im UV-Bereich Quatzküvetten verwendet werden.

Oftmals wurde die UV-Vis Photometrie verwendet, um die Konzentrationen der in der Probe befindlichen Stoffe zu berechnen. Dieses soll im Folgenden zunächst allgemein und dann für spezielle Fälle gesondert dargestellt werden.

<u>Messparameter</u>	Response	Fast
	Band Width	1,0 nm
	Scan Speed	200 nm/min
	Data Pitch	1,0 nm
	Range	<i>variabel</i>

7.3.1.1 Allgemeine Bestimmung der Konzentration

Laut des Lambert-Beerschen-Gesetzes ist die gemessene Extinktion (E_λ) von der Schichtdicke (d), der Konzentration (c) und dem Extinktionskoeffizienten des Stoffes bei derselben Wellenlänge (ϵ_λ) abhängig. Sobald man den Extinktionskoeffizienten kennt, lässt sich somit die Konzentration mit folgender Gleichung berechnen.

$$c(\text{Stoff } A) = \frac{E_\lambda}{d * \epsilon_\lambda}$$

Die Extinktionskoeffizienten der meisten eingesetzten Farbstoffe war bekannt (Tabelle II.2), wodurch ihre Konzentration berechnet werden konnte. Auch die Konzentration des LHCII konnte auf diese Art bei 670 nm bestimmt werden. Hier beträgt sein Extinktionskoeffizient $\epsilon_{\text{LHCII}, 670 \text{ nm}} = 546000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Butler & Kühlbrandt, 1988).

7.3.1.2 Bestimmung der Chlorophyll-Konzentration im Totalpigmentextrakt nach Porra et al. (1989)

Für die Bestimmung der Konzentrationen von Chl *a* und Chl *b* im Totalpigmentextrakt wurden entsprechende Aliquots in 80% Aceton gelöst und die Absorptionen bei 646,6 nm und 663,6 nm gemessen. Dies sind die jeweiligen Maxima der Chlorophylle im Q_y-Bereich ihrer Absorptionsspektren. Anschließend konnten die Konzentrationen mit folgenden Formeln bestimmt werden.

$$\begin{aligned} c(\text{Chl } a) [\mu\text{g} / \text{ml}] &= 12,25 * A_{663,6} - 2,55 * A_{646,6} \\ c(\text{Chl } b) [\mu\text{g} / \text{ml}] &= 20,31 * A_{646,6} - 4,91 * A_{663,6} \end{aligned}$$

Um den Gesamtchlorophyllgehalt des Totalpigmentextraktes zu bestimmen, wurden beide Konzentrationen addiert.

7.3.1.3 LHCP-Konzentrationsbestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung von LHCP musste dieses durch SDS denaturiert und somit gelöst werden. Hierfür wurden 10 µl LHCP mit 990 µl A₂₈₀-Puffer gemischt. Als Referenz wurden 10 µl Trispuffer (II6.2.1) statt des LHCP verwendet. Beide Proben wurden anschließend für 1 min bei 100°C gekocht, nach dem Abkühlen kurz anzentrifugiert und anschließend ihre Absorption bei 280 nm gemessen. Hier absorbieren die aromatischen Aminosäuren des Proteins, daher ist der Extinktionskoeffizient je nach Anzahl dieser Aminosäuren unterschiedlich. Beim nativen LHCP gilt:

$$0,1 \text{ OD}_{280 \text{ nm}, 1 \text{ cm}} = 53 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \text{ Protein}$$

A₂₈₀-Puffer

10 mM	Tris/HCl pH 6,8
2% (w/v)	SDS
1 mM	β-ME (erst vor Gebrauch zufügen)

7.3.1.4 Berechnung der Markierungsausbeute

Mit Hilfe der Absorptionsspektren konnten die Verhältnisse der in der Probe befindlichen Stoffe berechnet werden. Dieses wurde vor allem verwendet, um die Markierungsausbeute von Farbstoffen am LHCII zu bestimmen. Hierfür musste zunächst sichergestellt sein, dass

sich in der Probe keine freien Farbstoffmoleküle mehr befanden. Diese hätten ansonsten das Ergebnis verfälscht. Anschließend wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen, bei dem die Absorptionsmaxima aller beteiligten Stoffe vermessen wurden. Überlappten sich die Absorptionen beider Komponenten in ihren Absorptionsmaxima nicht, konnte nun jeweils ihre Konzentration wie in II7.3.1.1 dargestellt bestimmt und anschließend ihr molares Verhältnis berechnet werden.

Sobald eine Komponente auch im Absorptionsmaximum der zweiten absorbierte, mussten jeweils die Spektren der einzelnen Komponenten getrennt werden. Hierfür wurde zunächst ein Referenzspektrum von dieser ersten Komponente aufgenommen. Dabei befand sie sich allein im selben Puffer wie der Hybridkomplex. Anschließend wurde dieses Spektrum auf die Absorption im Hybridkomplex normiert (Abb. 2.7.1). Anhand der erhaltenen Absorptionswerte konnte nun die Konzentration dieser ersten Komponente bestimmt werden. Für die Konzentrationsbestimmung des zweiten Stoffes wurde das angepasste Referenzspektrum vom Spektrum des Hybridkomplexes abgezogen. Auf diese Weise erhielt man das Einzelspektrum des zweiten Stoffes, von dem nun ebenfalls die Konzentration berechnet und anschließend auch die Markierungsausbeute bestimmt werden konnte. Die Voraussetzung dieser Vorgehensweise war, dass sich die Absorptionseigenschaften beider Komponenten

durch die Verbindung im Hybridkomplex nicht veränderten.

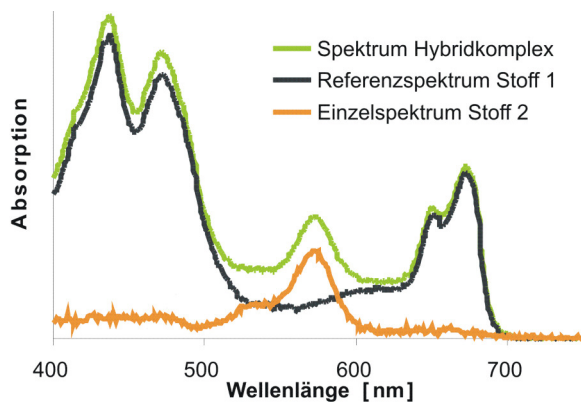


Abb. 2.7.1 Berechnung von Markierungsausbeuten.

Dargestellt am Beispiel eines Rho-NHS markierten LHCII. Die Konzentration von LHCII kann durch die Absorption des Referenzspektrums bei 670 nm, die Konzentration von Rho-NHS durch die Absorption des Einzelspektrums bei 590 nm bestimmt werden.

7.3.2 Fluoreszenzspektroskopie

In der Fluoreszenzspektroskopie werden Proben mit Licht bestimmter Wellenlängen angeregt und anschließend die daraus resultierende Fluoreszenz gemessen. Damit wurde in dieser Arbeit zum einen standardmäßig die korrekte Faltung des LHCII durch den komplexinternen Energietransfer überprüft. Zum anderen wurde die Fluoreszenzspektroskopie aber auch zur Beantwortung diverser Fragen bezüglich der hergestellten Hybridkomplexe sowie eines Energietransfers zwischen den Komponenten verwendet. In diesem Zusammenhang wurden die Hybridkomplexe und ihre jeweiligen Einzelkomponenten mit denselben Parametern gemessen. Die Auswertung erfolgte danach rechnerisch (II7.4).

Generell ergeben sich in der Fluoreszenzspektroskopie zwei Vorgehensweisen. Zum einen können die Proben bei einer einzigen Wellenlänge angeregt und zeitgleich ein Spektrum der Emission gemessen werden (Emissionsspektrum). Zum anderen kann aber auch die Emissionswellenlänge konstant gehalten und die Probe über einen Wellenlängenbereich angeregt werden (Excitationsspektrum). Das dabei erhaltene Spektrum ähnelt oft dem Absorptionsspektrum der entsprechenden Probe. Außerdem wurden zwei unterschiedliche Messanordnungen verwendet. In der Regel wurde die Fluoreszenz im 90°-Winkel zum eingestrahlten Licht gemessen. Bei konzentrierten Proben ($OD > 0,1$) kann es aber zu Reabsorptionseignissen in der Probe kommen, welche zu verfälschten Spektren führen. Daher wurde bei diesen Proben die sogenannte „Front face“-Anordnung verwendet, in der nur die Fluoreszenz der vordersten Schicht gemessen wird. Zusätzlich wurden alle Emissionsspektren mit dem gerätespezifischen Faktor „mcorrect“ verrechnet, welcher wellenlängenabhängige Detektionsunterschiede ausgleicht.

Alle Messungen wurden mit einer 5 mm dicken Küvette durchgeführt. Die am häufigsten verwendeten Messparameter sind in Tabelle II.20 dargestellt. Diese wurden aber wenn nötig variiert.

Tabelle II.20 Verwendete Parameter bei Fluoreszenzmessungen.

„HK“ steht dabei für Hybridkomplexe, „AF“ für Akzeptorfarbstoffe, „DF“ für Donorfarbstoffe, „Ex“ für Excitation und „Em“ für Emission.

Proben		Emissionspektren			Excitationspektren	
		LHCII-Faltung + HK mit AF	HK mit DF	HK mit QDs		
				I		II
Excitation		470 nm	550 nm	360 nm	470 nm	400-670 nm
Emission		600-750/800 nm	560-750 nm	500-750 nm	550-750 nm	680 nm
Inkrement		1 nm	1 nm	1 nm	1 nm	1 nm
Integrations-Zeit		0,5 sec	0,5 sec	0,5 sec	0,5 sec	0,1 sec
Spaltbreite	Ex	2 nm	2 nm	3 nm	2 nm	10 nm
	Em	2 nm	2 nm	4 nm	3 nm	1 nm

7.3.3 CD-Spektroskopie

Die CD- („Circular Dichroism“-) Spektroskopie ist eine Art der Absorptionsspektroskopie. Anders als bei der UV-Vis Photometrie wird dabei die Absorption von polarisiertem Licht gemessen. Die Probe wird sowohl mit links, als auch rechts zirkular polarisiertem Licht bestrahlt und anschließend die Differenz beider Absorptionen angezeigt. Optisch inaktive Stoffe weisen dabei keinen Unterschied im sichtbaren Wellenlängenbereich auf. Excitonisch gekoppelte Pigmente, wie sie im LHCII vorliegen, können allerdings ein signifikantes

Spektrum ergeben, dass gleichzeitig als Fingerabdruck für den LHCII dient. Nur wenn die Komplexe richtig assembliert sind, ergibt sich das typische Spektrum. Gleichzeitig kann man mit dieser Methode LHCII-Monomere von -Trimeren unterscheiden.

7.3.3.1 „Steady-State“-Messungen

In den „Steady State“-Messungen wurden alle rekonstituierten und aufgereinigten LHCII-Proben auf ihre Faltung und ihren Oligomerisierungsgrad hin überprüft. Zusätzlich wurde bei markierten Proben getestet, ob die Interaktion mit dem jeweiligen Farbstoff möglicherweise zu einer veränderten Struktur und damit Pigmentbindung im LHCII führt.

Diese Messungen wurden immer mit unverdünnten LHCII-Proben bei 4°C durchgeführt. Dabei wurde eine 2 mm-Küvette verwendet, damit das Signal nicht zu stark wurde. Als Basislinie wurde jeweils nur der entsprechende Puffer vermessen und dieses Spektrum anschließend vom Probenspektrum abgezogen.

<u>Messparameter</u>	Start	750 nm
	End	400 nm
	Data pitch	1 nm
	Scan speed	100 nm/min
	Band width	4 nm
	Response	4 sec
	Sensitivity	Standard

7.3.3.2 Stabilitätsmessungen

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie wurden auch Stabilitätsmessungen von LHCII-Proben mit und ohne kovalent gebundenen Farbstoffmolekülen durchgeführt, um eventuelle Änderungen aufgrund der Farbstoffbindung zu detektieren. Hierfür wurden annähernd gleich konzentrierte Proben in einer 1 mm-Küvette einem steigenden Temperaturgradienten ausgesetzt. Dieser führte dazu, dass die Komplexe mit der Zeit zerfallen, was wiederum zu einem Verlust des komplexspezifischen Minimums bei 492 nm und somit zu einem Anstieg des CD-Signals führte. Zur Auswertung der erhaltenen Spektren, wurden die Rohdaten mit dem Programm „Table Curve 2D 4.0“ (SPSS Inc, USA) an eine sigmoide Kurve („Asymmetric Sigmoid“) angepasst. Der Wendepunkt der angepassten Kurve wurde als „mittlere Zerfallstemperatur“ bezeichnet und konnte als Vergleichswert für die unterschiedlichen Proben verwendet werden.

<u>Messparameter</u>	Monitor	492 nm
	Start	20°C
	End	80°C
	Data pitch	0,2°C
	Delay time	0 sec

(Messparameter CD)	Temp. slope	1°C/min
	Band width	2 nm
	Response	2 sec
	Sensitivity	Standard

7.4 Energietransferberechnungen

Eine zentrale Frage der vorliegenden Arbeit bezog sich auf den Energietransfer zwischen den verschiedenen Komponenten in den hergestellten Hybridkomplexen. Hier wurde sowohl untersucht, in wieweit ein Energietransfer stattfindet, als auch in welchem Ausmaß der Energietransfer erwartet wurde. Beides wurde hauptsächlich rechnerisch beantwortet, die Grundlage der Berechnungen lieferten dabei die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften der beteiligten Komponenten und Hybridkomplexe.

7.4.1 Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten

Für Energietransferberechnungen ist die Kenntnis der jeweiligen Fluoreszenzquantenausbeute (Φ) der beteiligten Komponenten entscheidend. Sie gibt an, wie viele der aufgenommenen Photonen durch Fluoreszenz abgegeben werden. Von vielen Farbstoffen ist die Fluoreszenzquantenausbeute bekannt, jedoch ändern sich die Werte häufig in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Daher wurde in dieser Arbeit für die meisten der untersuchten Farbstoffe die Quantenausbeute im Saccharosegradientenpuffer (II6.7), also bei 0,1% LM bestimmt (vgl. Tabelle II.2). Hierfür wurden relative Messungen durchgeführt. Dabei wurde ein Farbstoff zum Vergleich herangezogen, der in demselben spektralen Bereich absorbierte und fluoreszierte, wie der Farbstoff, dessen Quantenausbeute bestimmt werden sollte. Anhand der Absorptionsspektren beider Stoffe wurde die Wellenlänge der Anregung gewählt. Sie lag möglichst bei beiden Stoffen in einem relativ konstanten Absorptionsbereich, um Messungenauigkeiten bezüglich der Wellenlänge zu minimieren. Anschließend wurde die Konzentration beider Farbstoffe so gewählt, dass ihre Absorption bei der gewählten Anregungswellenlänge identisch war. Nun wurde von beiden Farbstoffen ein Fluoreszenzemissionsspektrum (II7.3.2) mit der gewählten Wellenlänge als Anregung gemessen. Die erhaltenen Spektren wurden mit der Mittelpunktsregel (II7.4.7) integriert und anschließend konnte mit folgender Formel die unbekannte Quantenausbeute (Φ_{ges}) berechnet werden.

$$\phi_{ges} = \phi_{geg} \frac{\int Fluoreszenz_{ges}}{\int Fluoreszenz_{geg}}$$

Für einen möglichst geringen Fehler in der Bestimmung der Quantenausbeuten wurden bei der Fluoreszenzmessung möglichst kleine Spaltbreiten gewählt. Außerdem wurde immer

versucht, beide Farbstoffe in demselben Puffer zu lösen und zu messen, um mögliche Brechungsunterschiede der Lösungen zu verhindern.

7.4.2 Dekonvolution der Fluoreszenzemissionsspektren von Hybridkomplexen

Die Bestimmung des Energietransfers innerhalb der hergestellten Hybridkomplexe erfolgte anhand entsprechender Fluoreszenzemissionsspektren. Oftmals überlappten sich jedoch die Fluoreszenzspektren der einzelnen Komponenten und für eine Berechnung des Energietransfers mussten die jeweiligen Fluoreszenzanteile beider Stoffe am Summenspektrum mittels einer Dekonvolution ermittelt werden. Dies erfolgte über eine 2-Faktorenanalyse. Diese soll nachfolgend am Beispiel von Rho-LHCII-Hybridkomplexen beschrieben werden. Bei anderen Hybridkomplexen mussten dementsprechend die Wellenlängen und eventuell auch die Zuordnung von Donor und Akzeptor verändert werden.

Zuerst wurden die Verhältnisse der Fluoreszenzmaxima ermittelt. Die entsprechenden Wellenlängen der Maxima lagen bei 590 nm (Rho-NHS) und bei 680 nm (LHCII).

$$K = \frac{F_{DA590}}{F_{DA680}} \quad , \quad R = \frac{F_{D590}}{F_{D680}} \quad , \quad T = \frac{F_{A680}}{F_{A590}} \quad (I)$$

wobei:

F_{DA} – Fluoreszenz des Hybridkomplexes

F_D – Fluoreszenz der Donor-Referenz (Rho-NHS)

F_A – Fluoreszenz der Akzeptor-Referenz (LHCII)

Durch Umformung der Formeln erhielt man:

$$F_{DA590} = K * F_{DA680} \quad , \quad F_{D590} = R * F_{D680} \quad , \quad F_{A680} = T * F_{A590} \quad (II)$$

Da sich das gemessene Summenspektrum des Hybridkomplexes aus den Fluoreszenzspektren von Donor und Akzeptor zusammensetzte, galt außerdem:

$$\begin{aligned} F_{DA590} &= F_{Dfit590} + F_{Afit590} \\ F_{DA680} &= F_{Dfit680} + F_{Afit680} \end{aligned} \quad (III)$$

wobei:

F_{Dfit} – errechneter Anteil der Donoremission am gemessenen Summenspektrum des Hybridkomplexes

F_{Afit} – errechneter Anteil der Akzeptoremission am gemessenen Summenspektrum des Hybridkomplexes

Da die errechneten Teilspektren den tatsächlichen Fluoreszenzen entsprechen sollten, konnten diese weiterhin einander gleichgesetzt werden:

$$F_A = F_{Afit}, \text{ bzw. } F_D = F_{Dfit}$$

Durch die Gleichsetzungen und das anschließende Einsetzen der Gleichungen (II) in die Gleichungen (III) konnten die Faktoren (FT) zur Berechnung der Einzelspektren ermittelt werden:

$$FT_{Dfit590} = \frac{R(K * T - 1) * F_{DA590}}{R * K * T - K}, \quad FT_{Dfit680} = \frac{(T * (K - R)) * F_{DA680}}{1 - R * T} \quad (IV)$$

Nun konnten die Einzelspektren wie folgt berechnet werden:

$$FT_{Dfit(560-750)} = F_{D(560-750)} * \frac{FT_{Dfit590}}{F_{D590}}, \quad FT_{Afit(560-750)} = F_{A(560-750)} * \frac{FT_{Afit680}}{F_{A680}} \quad (V)$$

Zur Überprüfung der Dekonvolution wurden die erhaltenen Einzelspektren addiert und mit dem gemessenen Summenspektrum der Hybridkomplexe verglichen.

7.4.3 Berechnung der beobachteten Energietransfereffizienz

Die beobachtete Energietransfereffizienz wurde in erster Näherung durch die beobachtete Löschung der Donorfluoreszenz berechnet. Hierfür benötigte man das Fluoreszenzspektrum einer gleichkonzentrierten Donorreferenz, die somit die Fluoreszenzintensitäten in Abwesenheit des Akzeptors (F_{Dref}) darstellte. Zum anderen benötigte man das Einzelspektrum des Donors im Hybridkomplex (F_{Dfit} , II7.4.2). Anschließend wurde mit folgender Formel die beobachtete Energietransfereffizienz (ET_{ist}) berechnet, wobei die Integrationen mit der Mittelpunktsregel (II7.4.7) durchgeführt wurden:

$$ET_{ist} [\%] = \left(1 - \frac{\int F_{Dfit}}{\int F_{Dref}} \right) * 100$$

Zu einer vollständigen Abschätzung des Energietransfers wurde zusätzlich auch die sensibilisierte Akzeptorfluoreszenz miteinbezogen. Bei einem über FRET stattfindenden Energietransfer gilt, dass der Flächenverlust auf Seiten der Donorfluoreszenz (A_D) mit dem Flächenzugewinn auf Seiten der Akzeptorfluoreszenz (A_A) in demselben Verhältnis steht, wie die Fluoreszenzquantenausbeuten (Φ) beider Stoffe. Dies lässt sich mathematisch wie folgt ausdrücken:

$$\frac{A_D}{A_A} = \frac{\phi_D}{\phi_A}$$

Daher wurden diese Werte zur Abschätzung, ob die beobachtete Löschung der Donorfluoreszenz tatsächlich auf einen FRET-basierten Energietransfer zurückzuführen ist, miteinander verglichen. Um die Unterschiede im Energiebetrag verschiedener Wellenlängen zu berücksichtigen, war es sinnvoll, hierbei stattdessen Wellenzahlen zu verwenden. Diese sind direkt proportional zur Energie der Strahlung.

7.4.4 Berechnung von Försterradien

Försterradien sind ein wichtiger Parameter in der Theorie des FRET. Sie geben den Abstand zweier Moleküle an, bei dem der Energietransfer mit einer Effizienz von 50% stattfindet. Damit sind sie auch die Grundlage für die Berechnung des erwarteten Energietransfers (II7.4.5).

Der Försterradius (R_0) eines Donor-Akzeptor-Paares berechnet sich in Abhängigkeit des Überlappungsintegrals der Donorfluoreszenz und der Akzeptorabsorption ($J(\lambda)$), der Orientierung der Dipolmomente zueinander (κ), der Quantenausbeute des Donors (Φ_D) und des Brechungsindex der Umgebung (η) nach folgender Formel:

$$R_0 [\text{\AA}] = 0,211 \left(J(\lambda) * \kappa^2 * \phi_D * \eta^{-4} \right)^{1/6}$$

Dabei wurde angenommen, dass die Orientierung der Dipolmomente zeitlich nicht konstant ist. Dies liegt zum einen an der unterschiedlichen Orientierung der Dipolmomente der Chlorophylle im LHCII, zum anderen an der möglichen Beweglichkeit von kovalent gebundenen Farbstoffen. Daher wurde hier der Wert $\kappa = 2/3$ verwendet, welcher einer zufälligen Orientierung entspricht. Der Brechungsindex einer Proteinumgebung wurde mit $\eta=1,54$ (Sauer et al., 1987) beschrieben. Das Überlappungsintegral wurde wie folgt berechnet, wobei die Integration mit der Mittelpunktsregel (II7.4.7) stattfand:

$$J(\lambda) \left[\frac{\text{mol} * \text{nm}^4}{\text{l} * \text{cm}} \right] = \frac{\int F_D(\lambda) * \varepsilon_A(\lambda) * \lambda^4 d\lambda}{\int F_D(\lambda) d\lambda}$$

Dabei ist F_D die Donorfluoreszenz, ε_A der Extinktionskoeffizient des Akzeptors und λ die Wellenlänge der Lichtquelle.

7.4.5 Berechnung der erwarteten Energietransfereffizienz und Abstandsschätzungen

Die erwartete Energietransfereffizienz (ET_{soll}) konnte bei Kenntnis des Försterradius (R_0 ; II7.4.4) und des Abstandes (r) von Donor und Akzeptor mit folgender Formel berechnet werden:

$$ET_{\text{soll}} [\%] = \left(\frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \right) * 100$$

Der „center-to-center“-Abstand wurde dabei wie folgt überschlagen. Bei Hybridkomplexen von Farbstoffen und LHCII wurde zunächst der Abstand zwischen der interagierenden Aminosäure und dem Magnesiumion des nächst gelegenen Chlorophylls bestimmt. Dies geschah mit Hilfe des „Swiss-PDB-Viewer 4.0“ (Guex & Peitsch, 1997) anhand des PDB-Eintrags 2BHW (Standfuss et al., 2005). Anschließend wurde der Abstand zwischen dem letzten Atom der interagierenden Aminosäure und dem Mittelpunkt des Farbstoffes hinzugerechnet. Dieser wurde bei den drei Farbstoffen PDI-NHS, Rho-NHS und Rho-Mal mit 1 nm, bei PDI-Mal mit 2 nm veranschlagt.

Bei Hybridkomplexen von QDs und LHCII wurde dagegen nur der Radius des QDs als Abstand verrechnet. Dieser war allerdings sicher geringer als der eigentliche Abstand, bei dem noch der Ligand und die Distanz zwischen dem interagierenden Proteinabschnitt und dem nächst gelegenen Chlorophyll hinzuzurechnen ist. Diese beiden waren jedoch schwer zu bestimmen, da man erstens nicht wusste, ob der Ligand möglicherweise vom Protein verdrängt wird, und zweitens, wie sich der interagierende Proteinabschnitt ausrichtet (vgl. IV2.3.1).

7.4.6 Berechnung von QD-Löschungskonstanten

Die Berechnung von QD-Löschungskonstanten, welche die QD-Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit der verwendeten LHCII-Mutanten beschreiben, erfolgte mit Hilfe von Stern-Volmer-Diagrammen. Sie gehen auf die sogenannte Stern-Volmer-Gleichung zurück, in der das Verhältnis aus der Fluoreszenz des Donors in Abwesenheit (F_0) und in Anwesenheit des Akzeptors (F) berechnet und in einen Zusammenhang mit der Konzentration des Akzeptors („Quenchers“, Q) gestellt wird. Dabei ergibt sich folgende Formel:

$$\frac{F_0}{F} - 1 = c(Q) * K_{SV}$$

Die auftretende Stern-Volmer Konstante (K_{SV}) ist somit ein Maß für die beobachtete Fluoreszenzlöschung. Sie wurde in dieser Arbeit QD-Löschungskonstante genannt und wie folgt bestimmt. Zunächst wurde der Quotient aus der QD-Fluoreszenz in Ab- und Anwesenheit vom LHCII gebildet und dieser dann gegen das Konzentrationsverhältnis von LHCII und QD graphisch aufgetragen. Schließlich wurde an diese Datenpunkte eine Gerade gelegt, welche die x-Achse bei 0 schneidet und deren Steigung der Löschungskonstante entsprach.

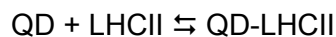
7.4.7 Integrieren mit der Mittelpunktsregel

Die Integration von gemessenen Spektren erfolgte mit der Mittelpunktsregel anhand folgender Formel:

$$\int f(x)dx = \sum_{i=1}^n \frac{(x_{i+1} - x_i) * (y_i + y_{i+1})}{2}$$

7.5 Berechnungen von apparenten QD-LHCII-Bindungskonstanten

Die Berechnung apparenter QD-LHCII-Bindungskonstanten diente der groben Einschätzung der Bindungsstärke beider Komponenten. Hierfür wurde angenommen, dass jeweils ein LHCII in einer Gleichgewichtsreaktion an einen QD bindet, was durch folgende chemische Gleichung ausgedrückt werden kann:



Wendet man für diese Gleichung das Massenwirkungsgesetz an, entspricht die Gleichgewichtskonstante der Assoziationskonstante (K_a). Hierbei gilt:

$$K_a [M^{-1}] = \frac{[\text{QD-LHCII}]}{[\text{QD}] * [\text{LHCII}]}$$

Für die Berechnung der Assoziationskonstante wurden somit die Konzentrationen der im Gleichgewicht befindlichen Einzelkomponenten, sowie des Hybridkomplexes benötigt. Hierfür wurden definierte Mengen an QD und LHCII gemischt und nach Einstellung des Gleichgewichts der freie bzw. ungebundene LHCII durch Ultrazentrifugation von den freien QDs und den Hybridkomplexen getrennt (II6.12.2). Anschließend konnte seine Konzentration über Absorptionsspektren bestimmt werden (II7.3.1.1). Bei der Annahme, dass jeweils nur ein LHCII an einen QD bindet, konnte dann die Konzentration der Hybridkomplexe und der freien QDs wie folgt berechnet werden:

$$\begin{aligned} [\text{QD-LHCII}] &= [\text{LHCII}_{\text{total}}] - [\text{LHCII}] \\ [\text{QD}] &= [\text{QD}_{\text{total}}] - [\text{QD-LHCII}] \end{aligned}$$

Dabei sind $[\text{LHCII}_{\text{total}}]$ und $[\text{QD}_{\text{total}}]$ die anfangs eingesetzten Konzentrationen der Einzelkomponenten.

Mindestens drei Mal wurden auf diese Weise die Assoziationskonstanten für verschiedene Ausgangsverhältnisse an QD und LHCII bestimmt. Von den erhaltenen Werten wurden dann das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet.

III Ergebnisse

1 Grünlückenfüllung des LHCII

Ein Ziel dieser Arbeit war die Optimierung der Absorptionseigenschaften vom LHCII. Gerade die geringe Absorption zwischen 500 – 600 nm sollte dabei verbessert werden, damit beim Einsatz des LHCII in Anwendungen zur Nutzung der Lichtenergie das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichtes optimal genutzt werden kann (Abb. 3.1.1). Hierfür wurde die Idee verfolgt, diese sogenannte Grünlücke durch Farbstoffe mit Absorptionsmaxima in diesem Wellenlängenbereich zu füllen. Die verwendeten Farbstoffe wurden wie in früheren Arbeiten

der Arbeitsgruppe, wenn auch mit anderen Zielen, kovalent an den LHCII gebunden (Wolf-Klein, 2001; Horn, 2004; Lion, 2005; Boggasch, 2006) und fungierten als Energiedonoren für den LHCII.

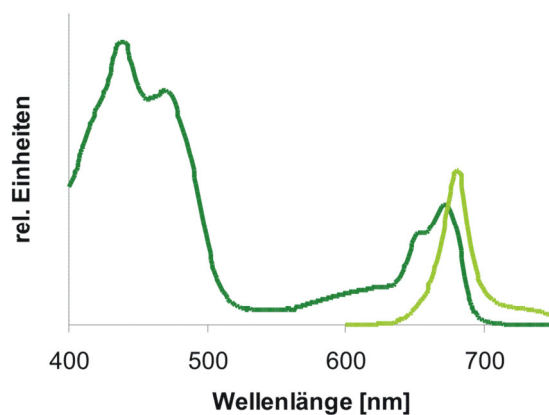


Abb. 3.1.1 Die Grünlücke des LHCII.

Absorptions- (dunkelgrün) und Fluoreszenzspektrum (hellgrün) vom LHCII in relativen Einheiten.

1.1 Markierung von Einzel-Cystein Mutanten mit PDI-Mal

Für die ersten Versuche die Grünlücke des LHCII mit Farbstoffen zu schließen, wurde ein neuer wasserlöslicher Perylen-Farbstoff verwendet (PDI-Mal; Peneva et al., 2008a). Er besitzt ein optimal in der Grünlücke befindliches Absorptionsspektrum und als reaktive Gruppe ein Maleimid, wodurch er kovalent an Cysteine binden kann (Abb. 3.1.2). Da dieser Farbstoff bisher nicht für Markierungen des LHCII genutzt wurde, galt es neben der Überprüfung seiner Tauglichkeit für die Grünlückenfüllung auch die Markierung von LHCII mit diesem Farbstoff an LHCII Mutanten mit einem singulären Cystein zu optimieren und zu charakterisieren.

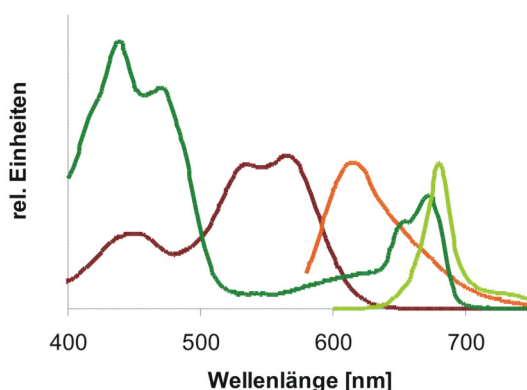


Abb. 3.1.2 Der Fluoreszenzfarbstoff PDI-Mal.

Normierte Absorptions- und Fluoreszenzspektren von PDI-Mal (rot und orange) und LHCII (dunkelgrün und hellgrün).

1.1.1 Markierungsbedingungen und –ausbeuten

Die Markierung von LHCP mit PDI-Mal erfolgte mit der LHCII-Mutante S3Ch nach dem Standardrezept für Markierungen mit cysteinreaktiven Farbstoffen (II.6.3.2). Dabei wird üblicherweise ein Überschuss an Farbstoff in den Reaktionsansatz gegeben, und in der Regel gilt, je mehr Farbstoff, desto besser die Markierungsausbeute. Um ein optimales Markierungsergebnis bei möglichst geringem Farbstoffverbrauch zu erhalten, wurden zunächst Markierungsansätze mit unterschiedlichen Farbstoffüberschüssen untersucht. Das aufgereinigte markierte Protein wurde dann über SDS-PAGE auf die Qualität der Markierung überprüft (Abb. 3.1.3 A).

Alle bei der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinproben zeigten bei Coomassiefärbung ein Signal, wohingegen nur markierte Proteine auch durch die Fluoreszenz detektiert werden konnten. Dies spricht für eine erfolgreiche Interaktion zwischen Protein und Farbstoff. Das Fluoreszenzsignal war allerdings bei den markierten Proben verschieden. Je größer der molare Überschuss an Farbstoff in den Markierungsansätzen desto stärker war auch das Fluoreszenzsignal. Von allen Proben wurde laut Coomassiesignal dieselbe Proteinmenge aufgetragen, somit gibt die Fluoreszenzstärke auch die relative Markierungsausbeute wieder, welche dementsprechend bei einem 20fachen molaren Farbstoffüberschuss am größten war. Der Unterschied zwischen einem 15fachen und einem 20fachen Überschuss fiel jedoch nur noch gering aus, daher wurde in weiteren Versuchen, um Farbstoff zu sparen, standardmäßig ein 15facher molarer Überschuss an PDI-Mal eingesetzt.

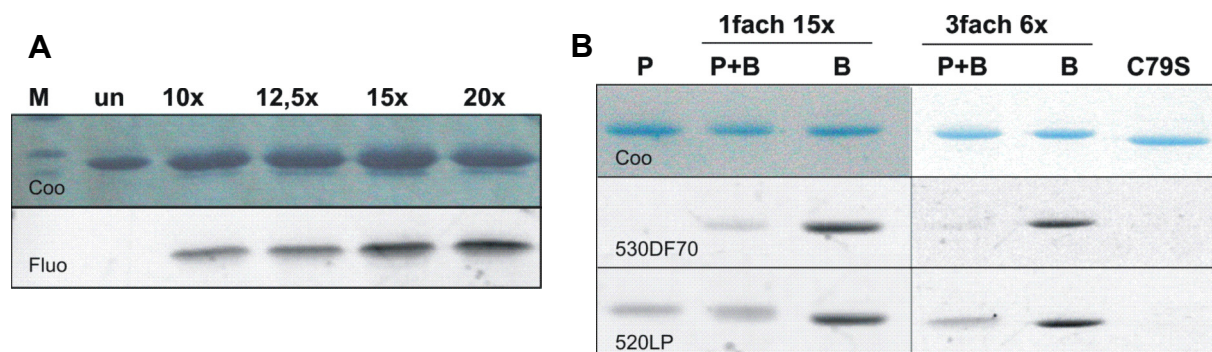


Abb. 3.1.3 Optimierung der Markierung von S3Ch mit PDI-Mal.

Coomassiefärbung und Fluoreszenzsignale von je 1 µg Protein aus unterschiedlichen Markierungsansätzen nach Auftrennung mit SDS-PAGE. A) Optimierung der eingesetzten Farbstoffmenge, M – Marker, un – unmarkiertes Protein, 10/12,5/15/20x – molarer Farbstoffüberschuss bei Markierung, Coo – Coomassiefärbung, Fluo – Fluoreszenzsignal. B) Optimierung der Reaktionszeit und Nachmarkierung mit Bodipy, P – nur PDI-markiertes, P+B – doppelt markiertes, B – nur Bodipy-markierter S3Ch, C79S – mit Bodipy markierter cysteinfreier Klon (Negativkontrolle), 1fach 15x – 15fach molarer Farbstoffüberschuss wurde komplett zum Protein gegeben, 3fach 6x – jeweils 6fach molarer Farbstoffüberschuss wurde im Abstand von mehreren Stunden zum Protein gegeben, 530DF70/520LP – Fluoreszenzsignale bei Verwendung verschiedener Filter der VersaDoc.

Als weitere Stellschraube in einer Markierungsreaktion dient die Inkubationszeit von Farbstoff und Protein. Maleimide können mit Luftsauerstoff abreagieren, weshalb getestet wurde, ob eine schrittweise Zugabe von PDI-Mal in den Markierungsansatz die Ausbeute erhöht. Die Auswertung erfolgte diesmal durch eine sogenannte Nachmarkierung mit einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff. Mit Bodipy-IAA wird unter Standardbedingungen eine nahezu vollständige Markierungsausbeute erreicht (Huschenbett, 2001), wodurch er als Indikator für nicht markierte Cysteine im Protein dienen kann. Zum einen wurde S3Ch mit dem üblichen 15fachen molaren Überschuss an PDI-Mal markiert, zum anderen wurde der Farbstoff in drei Portionen (je 6facher molarer Überschuss) zum Protein gegeben. Die Gesamtinkubationszeit war in beiden Ansätzen dieselbe. Da beide Farbstoffe fluoreszieren, wurden bei der Auswertung in der VersaDoc zwei verschiedene Filter benutzt. Bei der Verwendung von 520LP detektiert man die Fluoreszenz beider Farbstoffe, bei 530DF70 dagegen nur die von Bodipy-IAA (Abb. 3.1.3 B). Als Positivkontrolle diente S3Ch, welches nur mit Bodipy-IAA markiert wurde. Die Markierung der cysteinfreien LHCII-Mutante C79S erfolgte als Negativkontrolle. Hier konnte kein Bodipysignal detektiert werden. Dies belegt eine spezifische Interaktion zwischen Bodipy und Cysteinen. Das Bodipysignal bei einmaliger PDI-Mal Zugabe entsprach nach densitometrischer Auswertung noch 17% im Vergleich zur Positivkontrolle, nach mehrfacher Zugabe kleinerer PDI-Mal Mengen dagegen nur 8%. Dementsprechend verringert die gestaffelte Zugabe die Zahl der Cysteine, die mit Bodipy reagieren können. Im Umkehrschluss ist hier die Markierung mit PDI-Mal größer. Im Weiteren wurde aus Gründen der Zeitersparnis eine zweifache Zugabe von je 7,5fach molarem PDI-Mal-Überschuss als Standardmethode gewählt.

In der Regel wird die prozentuale Bodipy-Markierung im Umkehrschluss als Markierungsausbeute von dem ersten cysteinreaktiven Stoff angenommen (siehe z.B. Dockter, 2009). Bei der Markierung mit PDI-Mal ergab sich eine weitere Möglichkeit der Bestimmung der Markierungsausbeute. Da es sich um einen Farbstoff handelt, ist es auch möglich durch die Absorption des Farbstoffs im Verhältnis zum Protein die Markierungsausbeute zu bestimmen. Hier zeigte sich allerdings ein Widerspruch. Sollte die durch die Fluoreszenzanalyse nach SDS-PAGE ermittelte Markierungsausbeute nach mehrfacher PDI-Mal Zugabe bei 92% liegen, ergab sich nach der Analyse durch Absorptionmessungen nur eine Ausbeute von 31%. Allerdings bestätigte sich die Bodipy-Markierung des Gels von 8% durch eine rechnerische Ausbeute von 9,6%. Es ist also davon auszugehen, dass sich die Absorptionseigenschaften von PDI-Mal durch die Interaktion mit dem Protein verändern. Da man jedoch für diese Tatsache keinen Beweis hatte, sollte die Markierungsausbeute auf einem dritten Weg bestätigt werden.

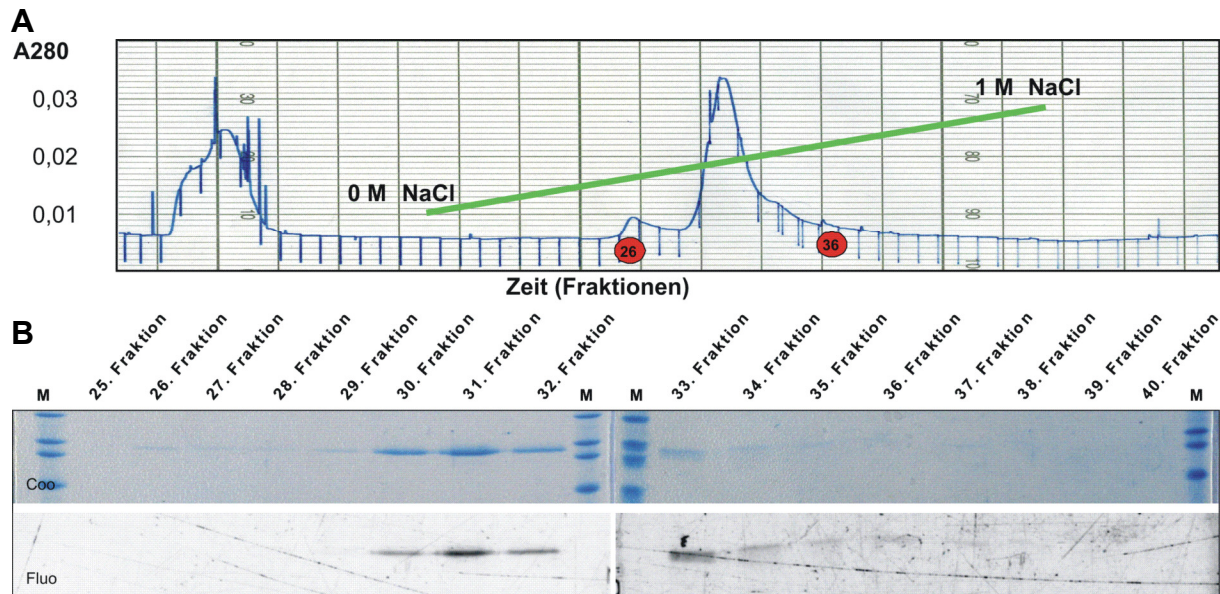


Abb. 3.1.4 Anionenaustauscher-Chromatographie von PDI-S3Ch.

A) Elutionsdiagramm eines FPLC-Laufs mit PDI-S3Ch bei pH 7,0, dabei wurde kontinuierlich die Absorption bei 280 nm (A280) gemessen, jeder vertikale Strich steht für eine neue Fraktion. Die Elution erfolgte über einen NaCl-Gradienten. B) Coomassie- und Fluoreszenzsignal ausgewählter Fraktionen aus der Chromatographie nach SDS-PAGE, M – Marker.

Die Idee war, nach der Markierung den in der Probe befindlichen PDI-Mal markierten S3Ch vom unmarkierten S3Ch zu trennen und anhand der erhaltenen Proteinmengen die Markierungsausbeute bestimmen zu können. Da von einer geringen Markierungsausbeute ausgegangen wurde, bot diese Methode einen weiteren Vorteil: nach erfolgter Trennung hätte man eine nahezu vollständig markierte Probe mit der man weitere Charakterisierungen durchführen könnte. PDI-Mal enthält durch seine vier Sulfonsäurereste vier potenziell negative Ladungen, welche dem unmarkierten Protein fehlen. Dadurch sollte es, bei entsprechendem pH, möglich sein, die beiden Proteinpopulationen durch Anionenaustauscher-Chromatographie zu trennen.

Allerdings erbrachte die Methode mit der FPLC trotz der Durchführung bei verschiedenen pH-Werten im Bereich zwischen 6,0 und 8,0, Verwendung zweier verschiedener Anionenaustauscher-Säulen und Optimierung der Proteinlöslichkeit im Puffer durch Einsatz verschiedener denaturierender Agenzien (z.B. Thioharnstoff, II7.1.2) nicht das erhoffte Ergebnis. Beim optimierten Verfahren zeigte das Elutionsdiagramm zwei Maxima in der Absorption bei 280 nm während des NaCl-Gradienten (Abb. 3.1.4 A). Die Auftrennung der fraglichen Fraktionen durch SDS-PAGE ergab in allen Fraktionen, die laut dem Coomassiesignal eine hohe Proteinmenge enthielten auch eine Fluoreszenz (Abb. 3.1.4 B). Fraktionen vor dem prominenten A280-Signal um Fraktion 30 zeigten zwar kein Fluoreszenzsignal, aber enthielten laut Coomassiesignal nur sehr wenig Protein. Fraktionen nach Fraktion 30 zeigten abnehmende Proteinmengen, die aber alle fluoreszierten.

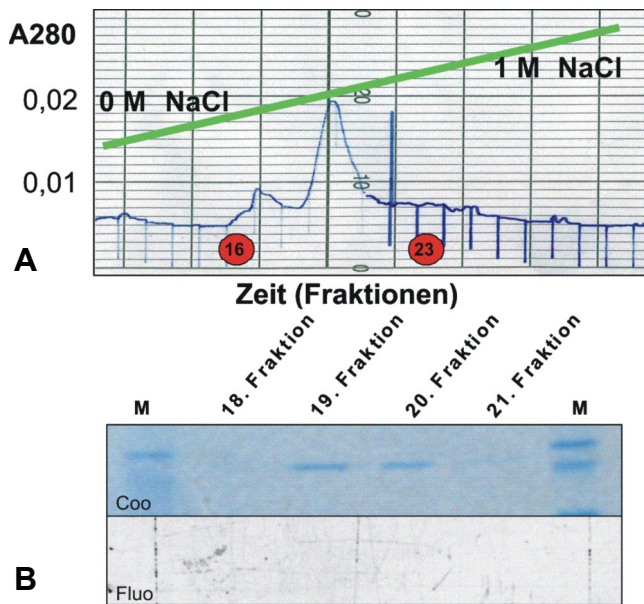
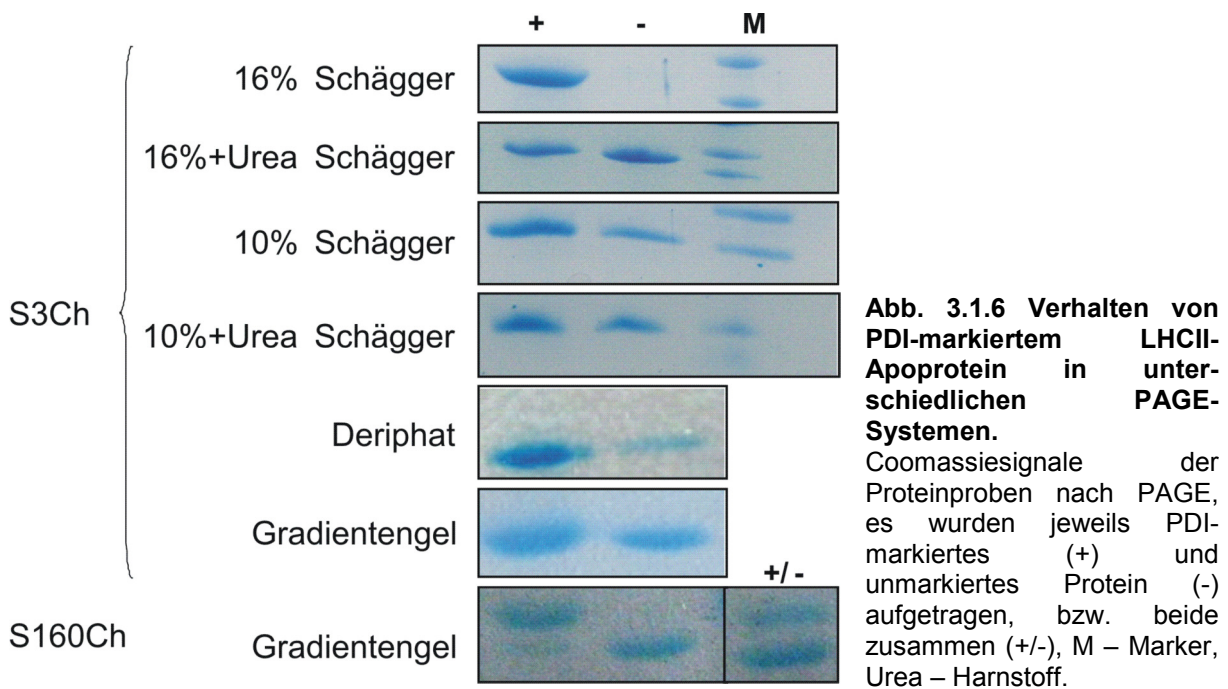


Abb. 3.1.5 Anionenaustauscher-Chromatographie von unmarkiertem S3Ch.

A) Elutionsdiagramm eines FPLC-Laufs mit unmarkiertem S3Ch, dabei wurde kontinuierlich die Absorption bei 280 nm (A280) gemessen, jeder vertikale Strich steht für eine neue Fraktion. Die Elution erfolgte über einen NaCl-Gradienten. B) Coomassie- und Fluoreszenzsignal ausgewählter Fraktionen aus der Chromatographie nach SDS-PAGE, M – Marker.

Als Kontrolle wurde ein FPLC-Lauf mit unmarkiertem S3Ch durchgeführt. Auch hier zeigten sich im Elutionsdiagramm wieder zwei potentielle Proteinpeaks (Abb. 3.1.5 A). Die Analyse in der SDS-PAGE ergab ein Coomassiesignal, welches nicht durch Fluoreszenz detektiert werden konnte (Abb. 3.1.5 B). Dieses bestätigte in den fraglichen Fraktionen die Elution von unmarkiertem Protein. Daher konnte kein Unterschied in dem Verhalten von markiertem und unmarkiertem S3Ch bei Anionenaustauscher-Chromatographie festgestellt werden, weshalb diese Methode als nicht erfolgreich angenommen wurde.

Eine weitere Möglichkeit, markiertes von unmarkiertem Protein zu trennen, ist in vielen Fällen eine optimierte Gelelektrophorese. Häufig verändert ein kovalent gebundener Farbstoff die Laufeigenschaften des markierten Proteins durch seine Größe und/oder Ladung. Daher wurde auch auf diesem Wege versucht PDI-S3Ch und unmarkierten S3Ch voneinander zu trennen. Wie schon in den vorherigen Abbildungen zu sehen war, unterschieden sich die Laufeigenschaften der beiden Proteinpulturen in dem standardmäßig verwendeten Lämmli-System nicht (Laemmli, 1970, vgl. Abb. 3.1.3 und Abb. 3.1.4). Daher wurde sowohl die Auftrennung in PA-Gelen nach dem von Schagger entwickelten System (Schagger & von Jagow, 1987; II7.2.1.2) mit verschiedenen Acrylamidmengen mit und ohne Zugabe von Harnstoff, sowie die Verwendung von Deriphatpuffer (II7.2.3) getestet. Jedoch zeigte sich kein Unterschied in den Laufeigenschaften von markiertem und unmarkiertem Protein (Abb. 3.1.6). Auch die Auftrennung von markiertem S3Ch in einem Gradientengel nach Fling und Gregerson (1986) erzielte nicht den erhofften Erfolg.



Als Alternative wurde ein weiterer LHCII-Klon mit einem singulären Cystein mit PDI-Mal markiert. Bei der Auftrennung von PDI-S160Ch und unmarkiertem S160Ch in einem Gradientengel konnte schließlich ein unterschiedliches Laufverhalten dokumentiert werden. Beim markierten Protein zeigten sich zwei Proteinbanden, eine auf Höhe des unmarkierten Proteins die andere mit einem deutlich größeren apparenten Molekulargewicht. Es wurde daher angenommen, dass die untere Bande dem unmarkierten Protein in der markierten Probe entspricht. Dieses wurde durch gemeinsames Auftragen von unmarkierter und markierter Probe bestätigt, da das untere, dem unmarkiertem Protein zugewiesene, Signal deutlich intensiver wurde. Ein densitometrischer Vergleich der Coomassiesignale in der markierten S160Ch-Probe ergab ein 5,7-mal stärkeres Signal in der höheren Bande, dies entspricht einer Markierungsausbeute von 85%. In der Annahme, dass sich das Cystein an Position 3 im S3Ch annähernd so gut markieren lässt wie an Position 160, bedeutet das ein zweites Argument für das densitometrische Ergebnis nach der Nachmarkierung mit Bodipy-IAA. Als Kontrollexperiment wurde PDI-S160Ch mit Bodipy nachmarkiert, wobei sich auch hier im Umkehrschluss eine Markierung von über 70% ergab (keine Abbildung).

Es wurde also davon ausgegangen, dass ein Großteil des LHCP in der Probe mit PDI-Mal markiert vorliegt. Daher wurden keine weiteren Aufarbeitungsschritte vor der nachfolgenden Charakterisierung des Hybridkomplexes für nötig erachtet.

1.1.2 Rekonstitution und Energietransfer von PDI-Mal markiertem S3Ch

Für die Verwendung von PDI-Mal in Hybridkomplexen ist es entscheidend, das PDI-markierter LHCII korrekt falten kann. Daher wurde PDI-S3Ch nach dem Standardprotokoll rekonstituiert und trimerisiert. Nach der Aufreinigung durch Ultrazentrifugation in Dichtegradienten wurden die Eigenschaften der markierten Trimere mit einer unmarkierten Probe verglichen.

Der funktionierende Energietransfer innerhalb des LHCII von Chl *b* zu Chl *a* ist ein wichtiges Kriterium für die korrekte Faltung des Komplexes. PDI-S3Ch Trimere zeigten nach Anregung von Chl *b* genau wie unmarkierte Komplexe nur eine Fluoreszenz bei 680 nm und keine Schulter bei ca. 660 nm (Chl *b*-Fluoreszenz; Abb. 3.1.7 A). Somit ist der komplexinterne Energietransfer nicht durch die Farbstoffbindung gestört. Die genaue Anordnung der gebundenen Chlorophylle lässt sich durch CD-Spektroskopie untersuchen. Auch hier waren keine Unterschiede zwischen unmarkierten und PDI-markierten S3Ch Trimeren festzustellen (Abb. 3.1.7 B). Dies wurde durch Pigmentanalysen bestätigt. Die Analyse der gebundenen Pigmente ergaben nur geringfügige Unterschiede zwischen den beiden Proben (Abb. 3.1.7 C). PDI-S3Ch hatte demnach etwas mehr Chl *a* (8,0 statt 7,9 Moleküle pro Monomer) und Nx (0,9 statt 0,8 Moleküle pro Monomer), jedoch die gleiche Menge an Chl *b* (5,9 Moleküle pro Monomer) gebunden.

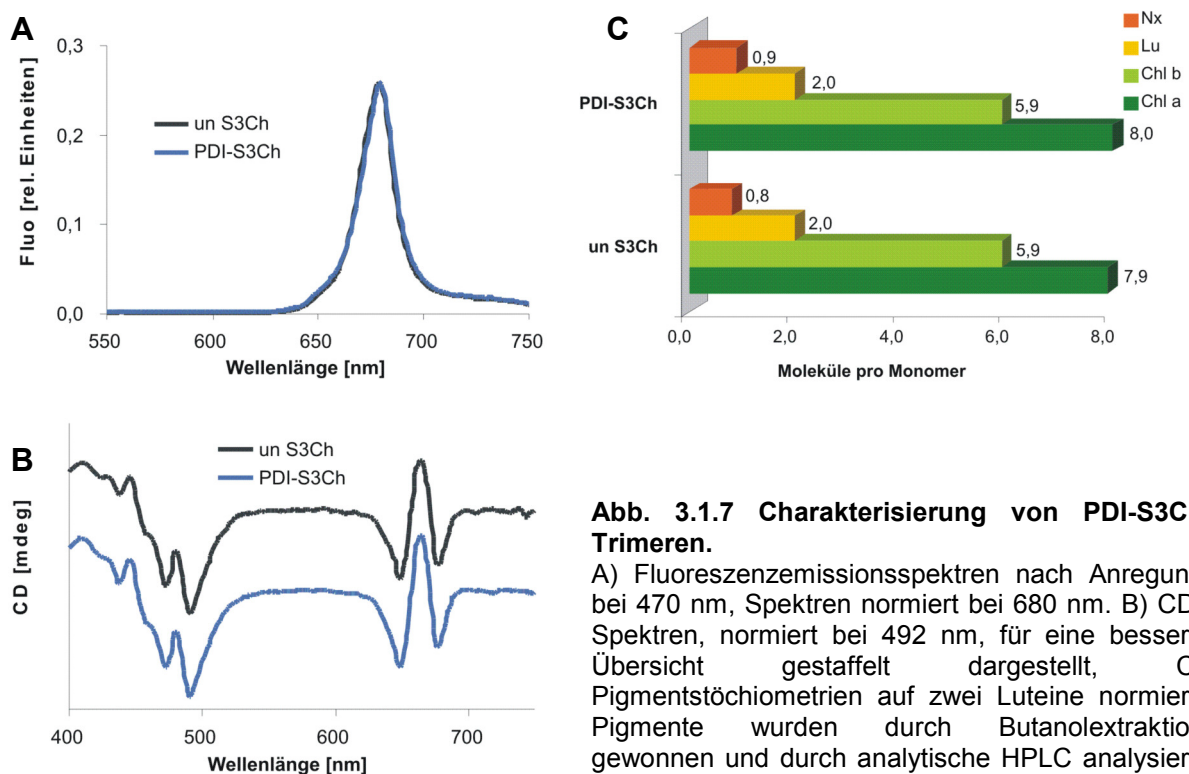


Abb. 3.1.7 Charakterisierung von PDI-S3Ch Trimeren.

A) Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei 470 nm, Spektren normiert bei 680 nm. B) CD-Spektren, normiert bei 492 nm, für eine bessere Übersicht gestaffelt dargestellt, C) Pigmentstöchiometrien auf zwei Luteine normiert, Pigmente wurden durch Butanolextraktion gewonnen und durch analytische HPLC analysiert, un S3Ch – unmarkierte Kontrolle.

Als weiteres Zeichen für eine veränderte Proteinstruktur gilt die Temperaturstabilität. Daher wurde das CD-Signal bei 492 nm während eines Gradienten von 20-80°C aufgenommen. Mit steigender Temperatur zerfallen die Komplexe, wodurch sich das Signal von einem anfänglich negativen Wert zu Null hin verändert (Abb. 3.1.8 A). Die Rohdaten wurden mit dem Programm „Tablecurve“ an eine sigmoide Kurve gefittet und der Wendepunkt der angepassten Kurve als „mittlere Zerfallstemperatur“ bezeichnet. Somit konnten die Graphen der unterschiedlichen Proben miteinander verglichen werden. PDI-S3Ch zeigte einen vergleichbaren Verlauf wie die unmarkierte Kontrolle. Dies wurde auch durch die Zerfallstemperaturen bestätigt, die bei beiden Komplexen sehr ähnlich war (Abb. 3.1.8 B). Bei unmarkierten S3Ch-Komplexen betrug sie 56,6°C, bei PDI-S3Ch 56,4°C.

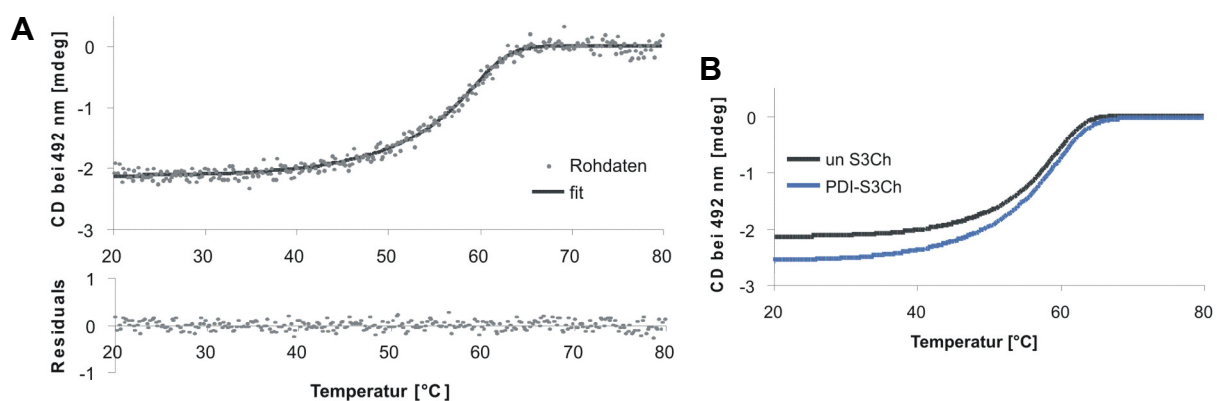


Abb. 3.1.8 Temperaturstabilität von PDI-S3Ch Trimeren.

Das CD-Signal bei 492 nm wurde kontinuierlich während eines Temperaturgradienten aufgenommen. A) Originaldaten, angepasster Graph und Residuals von unmarkierten S3Ch-Trimeren, B) angepasste Graphen von unmarkiertem S3Ch (un S3Ch) und PDI-S3Ch, beide Proben hatten dieselbe LHCII-Konzentration.

Bei diesen Untersuchungen war somit kein Einfluss von PDI-Mal auf die Komplexstruktur zu erkennen, jedoch konnte genauso wenig gezeigt werden, dass die untersuchten Trimere auch tatsächlich PDI-markierte Proteine enthielten. Daher wurden die Trimere durch Trypsin verdaut und anschließend sowohl die unverdauten als auch die verdauten Proben durch SDS-PAGE analysiert. Im gefalteten Komplex ist Trypsin nur in der Lage die acht N-terminalen Aminosäuren abzuspalten (Nußberger et al., 1993; Paulsen et al., 1993), wodurch in diesem Fall auch der an der dritten Aminosäure gebundene Farbstoff entfernt werden würde.

Alle Proben waren nach der Gelelektrophorese durch Coomassiefärbung zu detektieren, wobei das Signal des verdauten PDI-S3Ch ein deutlich niedrigeres apparentes Molekulargewicht aufwies (Abb. 3.1.9). Ein Fluoreszenzsignal konnte dagegen nur beim unverdauten PDI-S3Ch gemessen werden. Da es sich um ein denaturierendes Gel handelte, wurden die Komplexe zerstört und die nicht kovalent gebundenen Chlorophylle vom Protein getrennt. Im Gegensatz dazu bleibt der Farbstoff mit dem Protein verbunden. Daher kann

man auch nur in PDI-markierten Proben ein Fluoreszenzsignal erwarten. In der verdauten Probe wurden die ersten Aminosäuren durch Trypsin verdaut, wodurch die Peptidkette kleiner wird und das Protein in der Gelelektrophorese weiter läuft. Außerdem ist auf diese Weise der Farbstoff abgetrennt worden und somit keine Fluoreszenz auf Höhe der Proteinbanden mehr zu detektieren. Es konnte also sowohl gezeigt werden, dass sich in den Trimeren tatsächlich PDI-markierte Proteine befinden, als auch, dass der Farbstoff spezifisch an den N-Terminus gebunden ist.

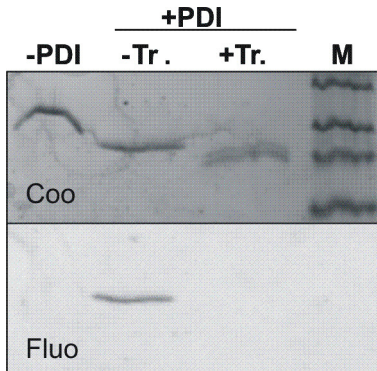


Abb. 3.1.9 Nachweis von PDI in S3Ch-Trimeren.

PDI-S3Ch Trimere wurden mit Trypsin verdaut und anschließend durch SDS-PAGE analysiert. Unverdaut unmarkierte bzw. markierte Trimere dienten als Kontrollen. Es wurde jeweils 1 µg Protein aufgetragen und durch Coomassiefärbung, bzw. Fluoreszenzaufnahme analysiert, +/- PDI – markiert bzw. unmarkierte Probe, +/- Tr. – verdaut bzw. unverdaut, Versuchsdurchführung im Rahmen der Diplomarbeit von Mara Werwie (Werwie, 2009).

Der Trypsinverdau stellt bei Markierungen mit Farbstoffen am LHCII-Klon S3Ch auch eine Möglichkeit dar, Energietransfer zwischen LHCII und Farbstoff zu analysieren. Bei PDI-S3Ch bedeutet das, dass man auf diese Art und Weise den Donor (PDI-Mal) vom Akzeptor (LHCII) räumlich trennen kann. Der Vergleich der Emissionsspektren nach Anregung des Donors (PDI-Mal) von verdauten und unverdauten Proben lässt Aussagen zu einem möglichen Energietransfer zu.

In diesem Fall zeigte sich erst nach Trypsinverdau ein deutliches Fluoreszenzsignal um 600 nm, welches PDI-Mal zuzuschreiben ist. In unverdauten Komplexen war diese Fluoreszenz nur in Ansätzen zu erkennen. Im Gegensatz dazu fluoreszierte der LHCII in beiden Spektren annähernd gleich stark (Abb. 3.1.10 A). Durch Dekonvolution beider Spektren und Vergleich der jeweiligen PDI-Anteile ergab sich in intakten, unverdauten PDI-S3Ch Trimeren eine gelöschte Donorfluoreszenz von 99% (Monomere: 70%). Ein entsprechender Vergleich der LHCII-Anteile ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Komplexen mit und ohne PDI-Mal. Die fast komplette Löschung der Donorfluoreszenz ist ein starkes Indiz für effizienten Energietransfer, allerdings wird dies nicht durch eine entsprechende sensibilisierte Akzeptorfluoreszenz bestätigt.

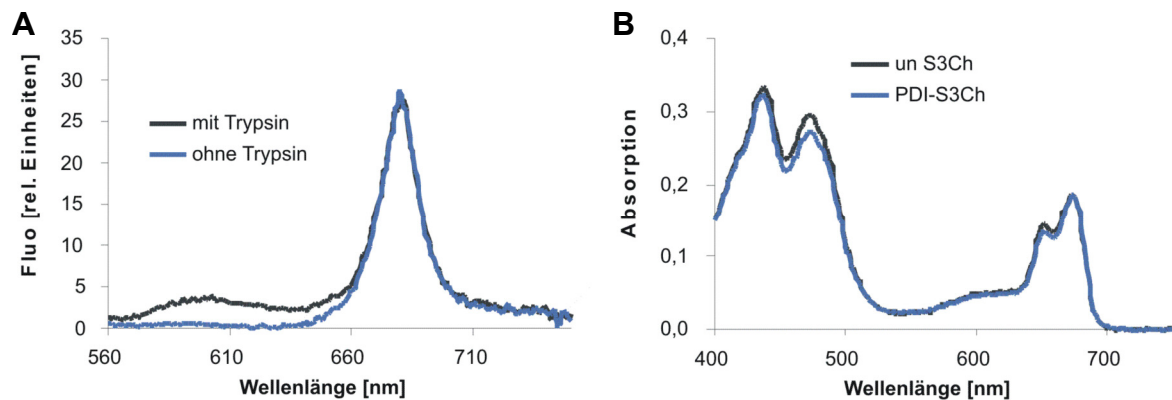


Abb. 3.1.10 Energietransfer und Füllung der Grünlücke bei PDI-S3Ch Trimeren.

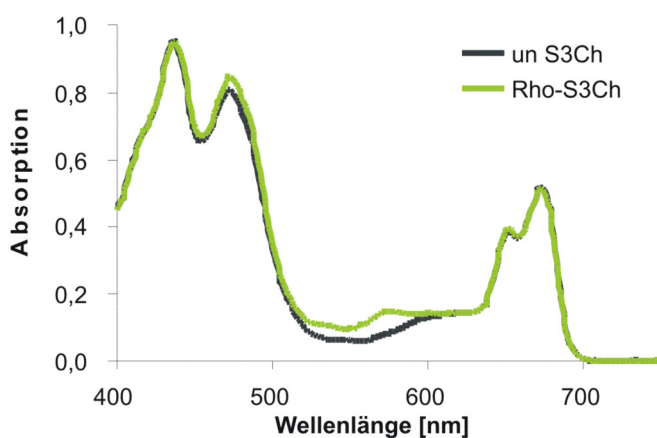
A) Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}}=550$ nm) von Trypsin verdauten und unverdauten PDI-S3Ch Trimeren. Es wurden jeweils 36 nM Lösungen verdaut, bzw. gemessen. B) Absorptionsspektren von PDI-S3Ch und unmarkierten S3Ch (un S3Ch) Trimeren, normiert bei 670 nm.

PDI-Mal kann somit S3Ch effizient markieren, die markierten Komplexe zeigen dieselben spektralen und biochemischen Eigenschaften wie unmarkierter LHCII und auch der Energietransfer von Farbstoff zu Protein scheint effizient. Die verbleibende Frage bezieht sich auf die Grünlückenfüllung des LHCII. Eine einfache Möglichkeit Farbstoff in den Komplexen nachzuweisen, ist der Vergleich von Absorptionsspektren markierter und unmarkierter LHCII. Hier sollte auf Grund der Lage des Absorptionsmaximums von PDI-Mal eine erhöhte Absorption um 550 nm zu sehen sein. In den tatsächlichen Spektren war dies allerdings nicht möglich (Abb. 3.1.10 B). Ein prominenter Unterschied ist dagegen um 470 nm auszumachen.

Eine Füllung der Absorptions-Grünlücke von LHCII ist somit mit Komplexen aus PDI-Mal und S3Ch nicht möglich.

1.2 Markierung von LHCII mit mehreren Farbstoffen

Das Ziel die Grünlücke in der Absorption des LHCII durch Farbstoffe zu schließen, konnte durch die Markierung von S3Ch mit PDI-Mal nicht erreicht werden. Auch die Verwendung von Rhodamin-Maleimid (Rho-Mal), einem anderen Maleimid-funktionalisierten und dadurch cysteinreaktiven Farbstoff mit einem erheblich höheren Extinktionskoeffizienten ($119.000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ im Vergleich zu $16.600 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ bei PDI-Mal), erbrachte nicht das erwünschte Ziel (Werwie, 2009). Zwar war bei Rho-markierten S3Ch-Trimeren eine verstärkte Absorption zwischen 500 und 600 nm im Vergleich zu unmarkierten Komplexen zu erkennen (Abb.



3.1.11), diese fiel jedoch nicht so gravierend aus, dass von einer wirklichen Füllung der Absorptionslücke geredet werden konnte.

Abb. 3.1.11 Absorptionsspektrum von Rho-Mal markierten S3Ch Trimeren.

Zum Vergleich dienen unmarkierte S3Ch-Trimere, Spektren wurden bei 670 nm normiert, Daten im Rahmen der Diplomarbeit von Mara Werwie erhoben (Werwie, 2009).

Dies ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, dass der LHCII eine Vielzahl von Chromophoren bindet und damit einen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{670 \text{ nm}} = 546.000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ besitzt. Ein einzelner gebundener Fluoreszenzfarbstoff kann dem nur eine sehr viel geringere Absorption in der Grünlücke entgegen setzen. Daher wurde in weiterführenden Versuchen der Gedanke verfolgt, so viele Farbstoffe wie möglich an den LHCII zu binden, um auf der einen Seite die Grünlücke möglichst effektiv zu füllen, auf der anderen Seite aber die Komplexstabilität des LHCII nicht zu beeinträchtigen. Als Varianten wurden erstens LHCII-Mutanten mit mehreren Cysteinen hergestellt, die mit cysteinreaktiven Farbstoffen reagieren können, zweitens wurden aminoreaktive Farbstoffe verwendet, die an freie Aminogruppen im Protein, z.B. in Lysinen, binden können.

1.2.1 Markierung von Mehrfach-Cystein Mutanten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden LHCII-Mutanten mit drei und vier Cysteinen verwendet. Diese wurden mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert. Als Möglichkeit einer optimierten Markierung wurde zudem ein verändertes Markierungsprotokoll erstellt.

1.2.1.1 Markierung am rekonstituierten LHCII

Bei der Markierung von LHCII-Mehrfach-Cystein Mutanten ist die Abfolge von Markierung und Reaktion eine interessante Frage. Standardmäßig erfolgt die Markierung mit cysteinreaktiven Farbstoffen am Apoprotein, die Rekonstitution erfolgt mit dem markierten Protein (Abb. 3.1.12 A). Dabei ist es entscheidend, dass die gebundenen Farbstoffe die korrekte Faltung des Proteins nicht stören. Als Alternative wurde im Rahmen dieser Arbeit das Protokoll gewissermaßen umgedreht. Zuerst sollte der LHCII rekonstituiert werden, die Markierung mit cysteinreaktiven Farbstoffen erfolgte dann am gefalteten Protein (Abb. 3.1.12 B).

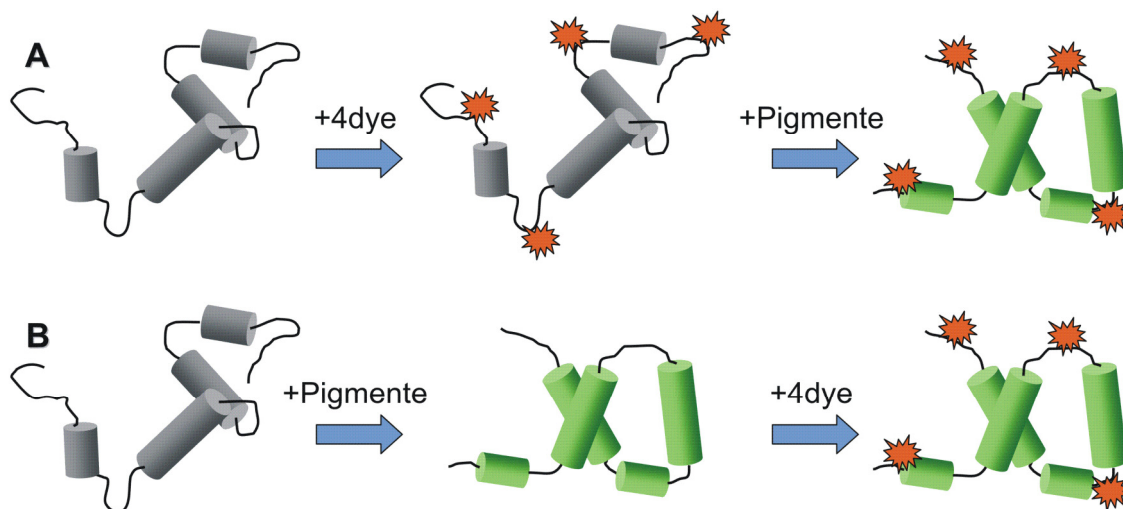


Abb. 3.1.12 Unterschiedliche cysteinreaktive Markierungsprotokolle.

A) Standardprotokoll: das Apoprotein wird markiert und das markierte LHCP anschließend rekonstituiert. B) Verändertes/neues Protokoll: zuerst wird der LHCII rekonstituiert, danach erfolgt die Markierung am gefalteten Komplex.

Die Optimierung des neuen Protokolls erfolgte mit S3Ch und dem Fluoreszenzfarbstoff DY731. Dabei wurde die Markierung von LHCII-Monomeren und -Trimeren getrennt betrachtet. Als Kontrolle diente eine standardmäßige Markierung am Apoprotein mit anschließender Rekonstitution. DY731-S3Ch Hybridkomplexe wurden schon in vorherigen Arbeiten (z.B. Boggasch, 2006) verwendet. Hier wurde eine Markierung des Apoproteins von annähernd 100% postuliert. Die Berechnung am gefalteten Komplex betrug im Durchschnitt bei Christian (2008) und Wiegand (2008) allerdings nur rund 57%.

Die standardmäßigen Reaktionsbedingungen unterscheiden sich von denen, die nach einer Rekonstitution vorliegen. Bei der Markierung von Apoproteinen wird in der Regel 1 µg/µl Protein bei pH 7,0 verwendet, die Reaktion verläuft bei 37°C optimal. Rekonstituierter LHCII ist dagegen temperatursensibel. Daher muss die Markierung bei 10°C erfolgen. In einem normalen Rekonstitutionsansatz ist außerdem die Proteinkonzentration niedriger (0,3 µg/µl) sowie der pH höher (pH 9,0).

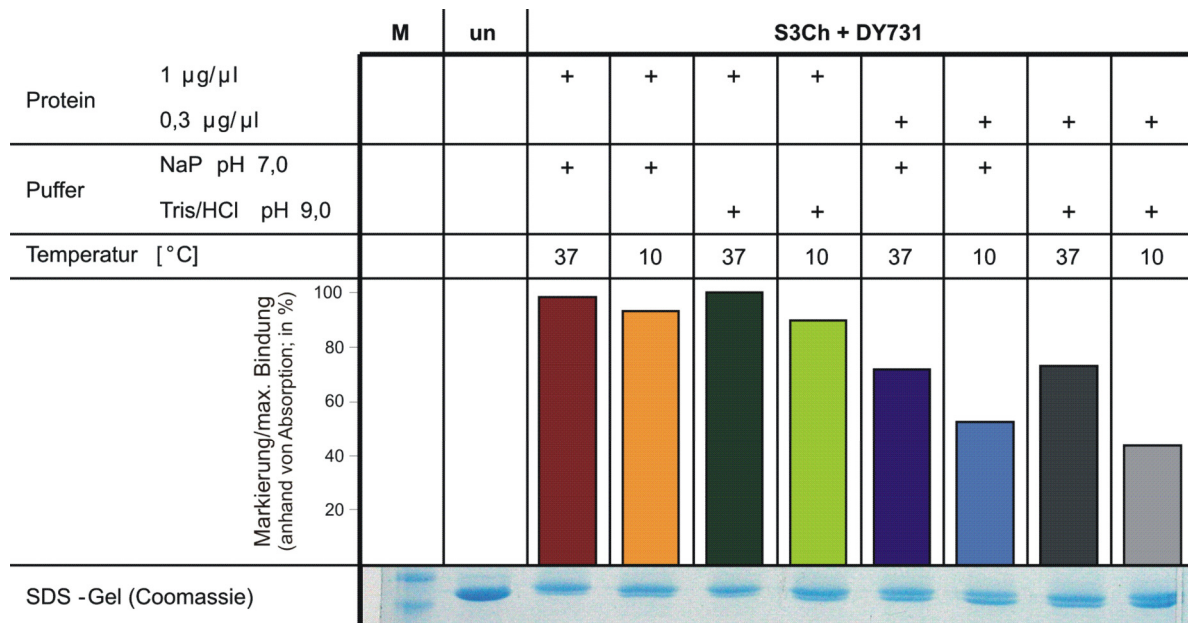


Abb. 3.1.13 Markierungsausbeuten bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.

Untersuchung der Markierung von S3Ch-Apoprotein mit DY731, es wurde die Proteinkonzentration im Reaktionsansatz (1 bzw. 0,3 µg/µl), der Puffer (NaP pH 7,0 bzw. Tris/HCl pH 9,0) sowie die Temperatur (10 bzw. 37°C) variiert. Die Auswertung erfolgte zum einen durch Absorptionsspektren und anschließender Berechnung der Markierungsausbeute, zum anderen durch SDS-PAGE, M – Marker, un – unmarkierte S3Ch-IBs.

Es wurde daher zunächst die Auswirkung von Unterschieden in den jeweiligen Parametern bei einer Markierung am Apoprotein getestet (Abb. 3.1.13). Die Markierungsausbeuten wurden dabei zur besseren Vergleichbarkeit auf die maximal erhaltene Ausbeute bezogen. So zeigte sich, dass die pH-Erhöhung kaum einen Einfluss auf die Markierungsausbeute darstellte. Unter ansonsten identischen Bedingungen ergab sich hier eine ebenso hohe Ausbeute wie bei der Markierung unter Standardbedingungen. Eine Erniedrigung der Reaktionstemperatur ergab dagegen eine deutlich verringerte Ausbeute. Sie lag bei Ansätzen mit 1 µg/µl Protein nur noch bei 92 bzw. 89%. Den größten Einfluss hatte allerdings eine geringere Proteinkonzentration. Selbst unter sonst optimalen Reaktionsbedingungen wurden nur noch 72% der maximalen Markierung erreicht. Dieses wurde durch eine zusätzliche Temperaturerniedrigung noch auf 52 bzw. 44% verringert. Für eine Markierung von gefalteten Monomeren bei den dann normalerweise vorliegenden Parametern konnte also nur noch ca. die Hälfte der normalen Markierungsausbeute, dementsprechend also ungefähr 30%, erwartet werden. Um diese schlechten Erwartungen zu verbessern, wurde im Folgenden besonders auf eine möglichst hohe Proteinkonzentration bei Markierungen von gefalteten Komplexen geachtet.

Bei der Rekonstitution von LHCII wird in der Regel β -ME eingesetzt. Das Reduktionsmittel sorgt dabei zusammen mit SDS für eine komplette Denaturierung des Apoproteins vor der Proteinfaltung. Auch bei der Markierung mit cysteinreaktiven Farbstoffen wird Reduktionsmittel verwendet, hier um die Cysteine des Proteins zu reduzieren, da oxidierte

Cysteine, die z.B. Disulfidbrücken gebildet haben, nicht mit den Farbstoffen interagieren könnten. Die bei diesen Reaktionen verwendeten Reduktionsmittel, z.B. TCyEP, enthalten keine SH-Gruppen, da sonst die Farbstoffe auch mit dem Reduktionsmittel reagieren könnten. Für eine Markierung von gefalteten Komplexen wurde daher getestet, ob die Ausbeute an gefalteten Komplexen durch die Wahl des Reduktionsmittels entscheidend verändert wird.

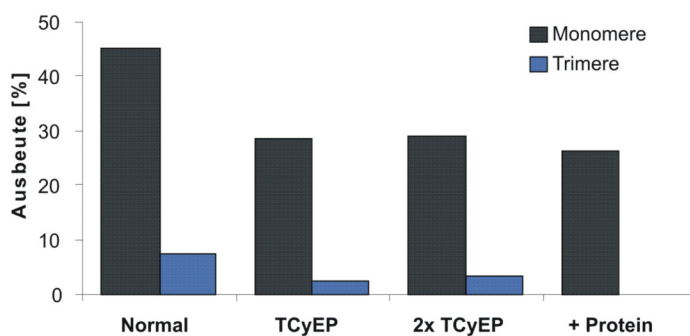


Abb. 3.1.14 Ausbeute korrekt gefalteter LHCII nach unterschiedlichen Rekonstitutionsbedingungen.

Es wurde jeweils S3Ch rekonstituiert bzw. trimerisiert, die Ausbeuten beziehen sich auf die eingesetzte Proteinmenge, Normal – Rekonstitution und Trimerisierung erfolgte nach dem Standardrezept, TCyEP/2x TCyEP – statt β -ME wurde 0,6/1,2 mM TCyEP verwendet, + Protein – es wurde 0,6 mM TCyEP und eine erhöhte

Proteinkonzentration in der Rekonstitution eingesetzt (0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, standardmäßig: 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Die Daten wurden teilweise von Dominik Christian im Rahmen seiner Staatsexamensarbeit ermittelt (Christian, 2008).

Bei einer standardmäßig ausgeführten Rekonstitution konnte nach der Ultrazentrifugation ungefähr die Hälfte des eingesetzten Proteins als Monomer, bei anschließender Trimerisierung ca. 10% als Trimer wieder gewonnen werden (Abb. 3.1.14). Bei dem Austausch von β -ME durch TCyEP wurde diese Ausbeute deutlich verringert. Die Ausbeute an Monomeren betrug nur ein Drittel, an Trimeren sogar nur noch wenige Prozent des eingesetzten Proteins. Diese Werte konnten durch die doppelte Menge an TCyEP nicht deutlich verbessert werden. Eine erhöhte Proteinkonzentration als zusätzliche Veränderung des Standardprotokolls verschlechterte die Ergebnisse allerdings nicht weiter.

Trotz einer deutlich schlechteren Komplexausbeute wurden diese Rekonstitutionsbedingungen auf ihren Erfolg bei Markierungen am gefalteten Komplex getestet. Die Inkubation von Monomeren nach einer standardmäßigen Rekonstitution mit Farbstoff ergab nach Ultrazentrifugation eine Markierungsausbeute von 42%, welches deutlich weniger ist, als nach einer Markierung des Apoproteins (Abb. 3.1.15). Durch eine erhöhte Proteinkonzentration in der Rekonstitution, und damit auch während der Markierung, konnte die Ausbeute auf 53% verbessert werden. Da dies annähernd der Ausbeute nach der Standardmethode entsprach, wurde dieses Protokoll für die Markierung von Monomeren etabliert.

Die Markierung von Trimeren im Ni-Säuleneluat ergab bei der Verwendung von TCyEP, neben der stark verringerten Ausbeute an gefalteten Komplexen (s. oben), mit 10% auch eine sehr geringe Markierungsausbeute. Diese Methode wurde deshalb nicht weiterverfolgt. Die Markierung an standardmäßig hergestellten Trimeren ergab eine Ausbeute von 53%,

welche durch Zugabe von TCyEP ins Ni-Säuleneluat vor der Markierung auf 56% erhöht werden konnte. Für die Markierung von Trimeren wurde außerdem die Inkubationszeit untersucht. Die verkürzte Inkubation von 3 h verringerte die Ausbeute drastisch auf 35%. Dagegen wirkte sich eine geteilte Farbstoffzugabe, ähnlich wie bei der Markierung von S3Ch mit PDI-Mal (vgl. III1.1.1), mit einer Ausbeute von 59% positiv aus. Eine zusätzlich verlängerte Inkubationszeit (üN + 6 h) verbesserte die Markierungsausbeute zwar noch, jedoch verringerte sich die Trimererausbeute (vgl. Christian, 2008). Daher wurde eine gestufte Farbstoffzugabe mit jeweils dreistündiger Inkubation und Zugabe von TCyEP als standardmäßige Eluatmarkierung für weitere Versuche verwendet.

Ein Problem bei der Markierung von rekonstituiertem LHCII stellte die Entfernung des überschüssigen Farbstoffs dar. Darauf wird im Weiteren noch näher eingegangen werden (vgl. III1.2.1.4 und IV1.3), hier soll aber darauf hingewiesen werden, dass die angegebenen Markierungsausbeuten durch Absorptionsmessungen am gefällten Protein ermittelt wurden.

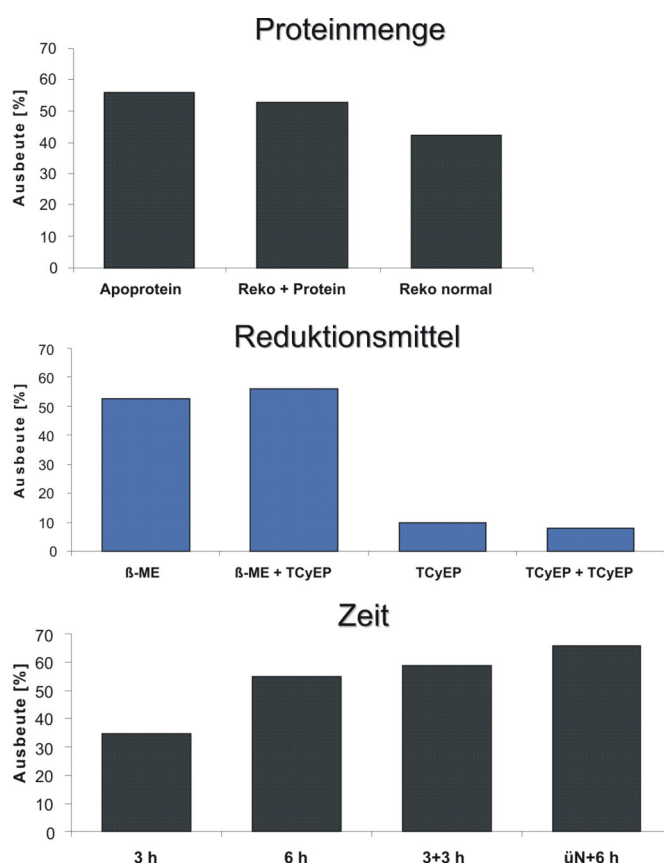


Abb. 3.1.15 Markierungsausbeuten bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.

Es wurde jeweils S3Ch mit DY731 markiert, die Bestimmung der Markierungsausbeute erfolgte über Absorptionsanalysen an Monomeren (Proteinmenge) bzw. Trimeren (Reduktionsmittel und Zeit). Angegeben sind Mittelwerte aus 2 bzw. 3 Einzelmessungen. Proteinmenge: Als Kontrolle galt die Markierung am Apoprotein mit anschließender Rekonstitution (Apoprotein), Reko normal/Reko + Protein - Markierung am rekonstituierten Komplex nach Standardprotokoll/mit erhöhter Proteinkonzentration. Reduktionsmittel: β -ME/TCyEP - Markierung an Trimeren nach standardmäßiger Rekonstitution und Trimerisierung/unter Verwendung von TCyEP statt β -ME, β -ME+TCyEP/TCyEP+TCyEP - in der Rekonstitution wurde β -ME/TCyEP verwendet, vor der Markierung wurde zusätzlich TCyEP hinzugeben. Zeit: Markierung an Trimeren mit

TCyEP/TCyEP, der Farbstoff wurde entweder einmalig hinzugegeben (3 h bzw. 6 h) oder in zwei Portionen (3+3 h bzw. üN+6 h). Die Daten wurden teilweise von Dominik Christian im Rahmen seiner Staatsexamensarbeit ermittelt (Christian, 2008).

1.2.1.2 Markierung von 3xCh mit PDI-Mal

Die Markierung von S3Ch, einer LHCII-Mutante mit singulärem Cystein, und PDI-Mal erbrachte keinen sichtbaren Erfolg für die Füllung der Grünlücke. Daher wurde die Idee entwickelt mehr als einen Farbstoff an den LHCII zu binden, welche durch die Herstellung von 3xCh möglich wurde (Wiegand, 2008). 3xCh besitzt drei Cysteine an den Positionen 3 (N-Terminus), 106 (lumenaler Loop) und 160 (stromaler Loop). Ein kovalent gebundener Farbstoff in diesen Regionen, sollte die native Struktur des LHCII nicht stark beeinflussen.

Die Markierung mit PDI-Mal erfolgte am Apoprotein, die anschließende Rekonstitution und Trimerisierung erbrachte funktionstüchtige LHCII, welche zum unmarkierten Protein vergleichbare spektrale und biochemische Eigenschaften aufwiesen und laut Absorptionmessungen am Apoprotein zu 41% je Cystein markiert waren (demnach 1,43 PDI-Moleküle je Monomer, vgl. Werwie, 2009). Die entscheidende Frage lautete nun, ob die Mehrfachmarkierung mit PDI-Mal einen Fortschritt in der erhofften Grünlückenfüllung erbrachte. Das Absorptionsspektrum von PDI-3xCh im Vergleich zu unmarkiertem LHCII wies tatsächlich eine erhöhte Absorption um 550 nm auf, das errechnete Differenzspektrum von markierten und unmarkierten Komplexen ergab ein Signal, welches sich zwischen 500 und 600 nm mit dem des freien Farbstoffes deckte (Abb. 3.1.16). PDI-Mal wurde in diesen Komplexen zu 99% gequenchet (keine Abbildung). Demnach waren die Komplexe tatsächlich

mit PDI-Mal markiert und die zusätzlich absorbierte Energie konnte auch auf den LHCII übertragen werden. Die Effizienz der Grünlückenfüllung war allerdings sehr gering, weshalb in weiterführenden Versuchen Rho-Mal verwendet wurde, der einen deutlich höheren Extinktionskoeffizienten besitzt.

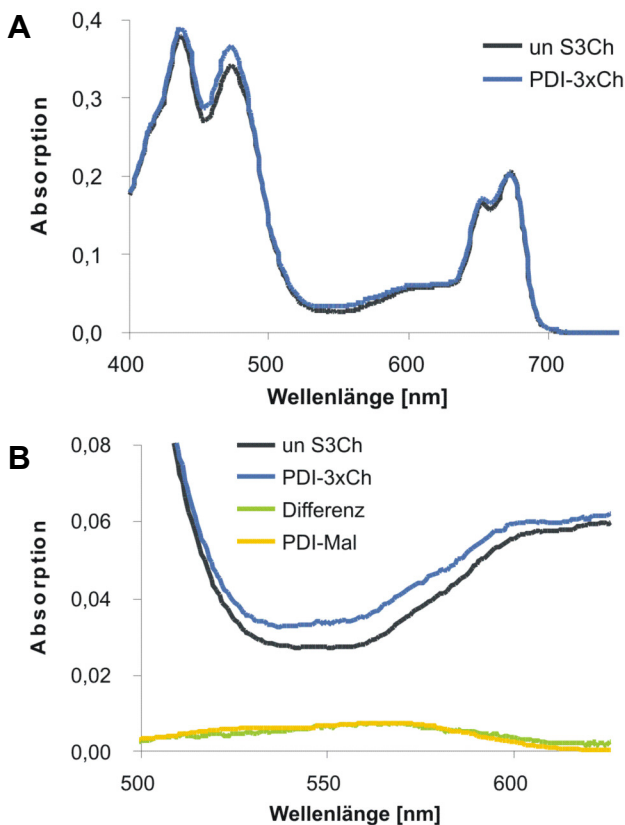


Abb. 3.1.16 Absorptionsspektren von PDI-markierten 3xCh-Trimeren.

A) Als Vergleich dienen unmarkierte S3Ch-Trimere (un S3Ch), Spektren normiert bei 670 nm. B) Vergrößerter Ausschnitt von A), zeigt zusätzlich das Differenzspektrum von markierter zu unmarkierter Probe (Differenz), sowie das Spektrum von freiem PDI-Mal in derselben Konzentration wie in den markierten Komplexen (PDI-Mal), Daten wurden von Mara Werwie im Rahmen ihrer Diplomarbeit ermittelt (Werie, 2009).

1.2.1.3 Markierung von 3xCh mit Rho-Mal: Publikation I. Gundlach et al., Filling the 'green gap' of the major light-harvesting chlorophyll a/b complex by covalent attachment of Rhodamine Red, BBA, 1787, 1499-1504.

Filling the “green gap” of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex by covalent attachment of Rhodamine Red

Kristina Gundlach, Mara Werwie, Sabine Wiegand, Harald Paulsen^{*}

Institut für Allgemeine Botanik, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz,
Müllerweg 6, 55128 Mainz, Germany

^{*} Corresponding author:

Email: paulsen@uni-mainz.de, Tel: +49/6313/39-24633, Fax: +49/6131/39-23787

Keywords: FRET (Förster resonance energy transfer), LHCII, maleimide dye, photosynthesis, site-specific labeling, solar spectrum

Abstract

The major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex (LHCII) greatly enhances the efficiency of photosynthesis in green plants. Recombinant LHCII can be assembled *in vitro* from its denatured, bacterially expressed apoprotein and plant pigments. This makes it an interesting candidate for biomimetic light harvesting in photovoltaic applications. Due to its almost 20 pigments bound per apoprotein, LHCII absorbs efficiently in the blue and red spectral domains of visible light but less efficiently in the green domain, the so-called “green gap” in its absorption spectrum. Here we present a hybrid complex of recombinant LHCII with organic dyes that add to LHCII absorption in the green spectral region. One or three Rhodamine Red dye molecules were site-specifically attached to cysteine side chains in the apoprotein and did not interfere with LHCII assembly, function and stability. The dyes transferred their excitation energy virtually completely to the chlorophylls in LHCII, partially filling in the green gap. Thus, organic dyes can be used to increase the absorption cross section and, thus, the light-harvesting efficiency of recombinant LHCII.

Introduction

The photosynthetic apparatus in plants is the result of a 3-billion year evolution process to optimize its efficiency in converting solar energy primarily into an electrochemical potential and then into other forms of energy. Therefore, many attempts have been made to adopt structural components of the natural solar energy converter to improve technical applications such as photovoltaic devices [1]. Some of these biomimetic approaches included biological components such as photosystems attached to a metal or semiconductor surface to produce a photovoltaic cell [2; 3]. Others adopted structural principles of the natural model; one example of this approach is the Grätzel solar cell using sensitizer dyes, mimicking photosynthetic reaction centers, for light-driven separation of electrons and positive charges [4].

All natural photosynthetic systems, whether in plants or bacteria, contain light-harvesting components. These increase the efficiency of photosynthesis by collecting light energy and conducting the excitation energy to the photosynthetic reaction centre where the actual charge separation takes place [5]. Photovoltaic devices, too, have made use of this principle [6]. Again, one possibility for adding a light-harvesting function to a photovoltaic device is to include the corresponding biological structures, the light-harvesting complexes from photosynthesizing organisms. Several natural light harvesters have been proposed for this purpose. These include self-organized aggregates of bacteriochlorophyll *c* (BChl *c*), mimicking the chlorosome structure in green sulphur bacterial [7], the ring-shaped light-harvesting complexes LH1 and LH2 from purple bacteria [8], peridinin-chlorophyll proteins (PCP) from dinoflagellates [9], and the major light-harvesting complex LHCII from green plants [10; 11]. The latter is a particularly promising candidate since it has a high density of pigments; the concentration of chlorophylls (Chl) in LHCII crystals amounts to 0.3 M [12] which cannot be achieved in organic solvents without massive concentration quenching of excited Chl [13]. The Chl density in LHCII is only topped by that in chlorosomes, in which BChl *c* self-organizes in the absence of a protein scaffold [14; 15]. On the other hand, the protein moiety in LHCII is advantageous for integrating the complex into an artificial device since the recombinant version of LHCII can be made with a large variety of binding anchors such as histidine or biotin tags and sulfhydryls for attaching it to other components [16; 11]. An extra plus of LHCII may be the possibility to switch it back and forth between a light-harvesting and energy dissipating state by a conformational change [17]; this possible functional switch, however, is still under debate [18].

One disadvantage of LHCII for its potential use as a light-harvesting component is its incomplete absorption of the solar light spectrum. LHCII absorbs well in the blue and red spectral domains but in the green gap, between 500 and 600 nm, its absorption is rather low. An attempt has been described to fill the green gap in the photosynthesis action spectra of

isolated chloroplasts by adding Rhodamine-labeled lipids to the thylakoid membrane [19]; the Rhodamine molecules stochastically distributed in the membrane would then transfer their excitation energy to a Chl provided they were close enough to one of the photosystems. In this work we demonstrate that the green gap can at least partially be filled by attaching one or more Rhodamine dyes directly to the apoprotein of LHCII. A similar approach has been reported to fill the green gap in chlorosome-like Zn-chlorin assemblies by attaching a naphthalene bisimide dye to each Zn-chlorin molecule [20].

Materials and Methods

LHCII mutants

For reconstitution of LHCII, two bacterially expressed apoprotein derivatives of *Lhcb1*2* (AB80) from *Pisum sativum* [21] were used. The first contains a single cysteine at position 3 (S3Ch), the second three cysteines at positions 3, 106, 160 (3xCh). In both mutants, the native Cys79 is exchanged with serine and a hexahistidyl (His₆) tag is added to the C terminus. The construction of a plasmid coding for S3C (as S3Ch but without the His₆ tag) was described in Wolf-Klein et al. [10]. The His₆ tag was added as specified elsewhere for the construct C2.4h [16]. The plasmid coding for 3xCh was constructed by ligating the appropriate EcoRI/XhoI restriction fragments of plasmids coding for the double mutant S3C/S106C and the single mutant S160Ch [22].

Preparation and labeling of LHCII apoprotein

The proteins were expressed in *Escherichia coli* as described earlier [23]. For labeling the proteins were dissolved in 0.5% (w/v) lithium dodecyl sulfate, 20 mM sodium phosphate (pH 7) to a final protein concentration of 1 mg/ml and denatured by heat treatment (2 min, 100 °C). The cysteines were reduced by adding 2 mM tris-(2-cyanoethyl)phosphine and incubation for 2 h at 37 °C. Rhodamine Red® C2 maleimide (Invitrogen, Germany) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and added to the solution in a 15-fold molar excess over cysteine (the final DMSO concentration never exceeded 4% (v/v)). Afterwards the samples were incubated at 37 °C over night. The proteins were precipitated by adding 0.1 volume of 100 mM acetic acid and 2.3 volumes of acetone and incubation at -20 °C for at least 3 h. The protein was collected by centrifugation (22000 x g for 15 min at 4 °C), washed several times with 70% ethanol and once with 100% ethanol and dried at room temperature for 5 min.

Preparation of recombinant LHCII trimers

Total pigment extract, chlorophylls *a* and *b* (Chl *a*; Chl *b*) and carotenoids were isolated from pea thylakoids [24]. Unlabeled and labeled LHCII apoproteins were reconstituted to monomers by the detergent exchange method [25] and trimerization was carried out by affinity chromatography [26]. For separating monomers and trimers and for removing unbound pigments and unfolded protein, the reconstitution solution was ultracentrifuged through a sucrose density gradient as described earlier [27].

Absorption measurements

Absorption spectra were measured at room temperature using a V550 UV-Vis spectrophotometer (Jasco, Germany). The concentration of LHCII was determined by measuring the absorption at 670 nm ($\epsilon = 546,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; [28]). Difference spectra between labeled and unlabeled samples were computed and the resulting dye spectra with their maximum at 573 nm were used to calculate dye concentrations ($\epsilon = 119,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; according to the manufacturer) and, thus, labeling stoichiometries, assuming that the extinction coefficient remains unchanged upon protein binding.

Fluorescence measurements

Fluorescence measurements (emission spectra: $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ and 550 nm , excitation spectra: $\lambda_{\text{em}} = 680 \text{ nm}$) were recorded with a Fluoromax-2 spectrometer (Jobin Yvon, Germany). LHCII samples to be measured were diluted to 37 nM ($A_{670} = 0.02$), free dye samples had the same concentration as dye in labeled samples. Fluorescence emission spectra were corrected for the wavelength-dependent sensitivity of the fluorimeter.

For energy transfer calculations, emission spectra of LHCII and dye were deconvoluted and fitted spectra, representing only the dye or LHCII contribution to the measured spectra, were integrated with the rectangle rule.

CD measurements

CD spectra were measured with a J-810-S spectropolarimeter (Jasco, Germany) equipped with a temperature regulating unit. Correct folding and oligomerization was verified by steady state measurements [23]. For stability measurements the signal at 492 nm was monitored over a temperature range from 20 °C – 80 °C (data pitch 0.2 °C, temperature slope 1 °C/min). The data were fitted to a sigmoidal function with Table Curve 2D 4.0 (SPSS Inc, USA) and the quality of the fits was assessed using residual R^2 criteria and plots of residuals. The temperatures at the inflection points of the fitted curves were taken as a measure of complex stability.

Pigment analysis

Pigments of LHCII samples were extracted with sec-butanol similar to [29]. LHCII samples were mixed with 2/3 vol of sec-butanol and 1/3 vol of 5 M NaCl, mixed thoroughly and centrifuged for 1 min at 22000 x g. The butanol phase containing the pigments was diluted 2-fold with 70% (v/v) acetone and analyzed via HPLC (RP-18 HPLC column, Chromolith SpeedROD, Merck, Germany). The pigments were eluted by a gradient of 70%-100% (v/v) acetone at a flow rate of 1.5 ml/min. Quantitation was performed as in [23] on a pigment per 2 lutein level.

Determination of fluorescence quantum yield and Förster distances

The fluorescence quantum yield (ϕ_F) of Rhodamine Red was measured at room temperature in 0.1% (w/v) β -dodecylmaltoside using water-soluble perylene maleimide in water as a reference [30] and determined as 0.5; ϕ_F of LHCII was determined likewise as 0.2 with Fluorescein as a reference [31].

The Förster distance (R_0) of Rhodamine Red to Chl *a* and Chl *b* was calculated with the following equation [32]

$$R_0 = 0.211[\kappa^2 * \eta^{-4} * \phi_F * J(\lambda)]^{1/6} \text{ \AA} \quad (1)$$

Here κ^2 is the orientation factor, η the refractive index of the solvent, ϕ_F the fluorescence quantum yield of the donor (Rhodamine Red) and $J(\lambda)$ the overlap integral between donor emission and acceptor absorption spectra. As a first approximation $\kappa^2 = 2/3$ (for randomly oriented dipole moments) and $\eta = 1.54$ (refractive index for protein environment [33]) were used. The overlap integral was calculated with [32]

$$J(\lambda) = [\int F_D(\lambda) * \epsilon_A * \lambda^4 d\lambda] / [\int F_D(\lambda) d\lambda] \text{ mol}^{-1} \text{ l} * \text{cm}^{-1} * \text{nm}^4 \quad (2)$$

F_D is the fluorescence intensity of the donor (Rhodamine Red), ϵ_A the molar extinction coefficient of the acceptor (Chl) and λ the wavelength.

Distance estimates based on the LHCII crystal structure

Distances inside the LHCII complex were calculated center to center with Swiss-PdbViewer 4.0 [34] using the pdb entry 2BHW [12]. The distance between the S atom of cysteine residues and the fluorophore centre of Rhodamine Red was estimated with an approximate maximal length of 1 nm.

Results

A fluorescent dye partially fills the green gap in LHCII absorption and excitation

The fluorescent dye Rhodamine Red was bound to LHCII to fill the green gap in the LHCII absorption and excitation spectra. The sulfhydryl-reactive maleimide derivative of the dye was coupled either to the single cysteine residue in the recombinant LHCII derivative S3Ch or to the three cysteines in 3xCh. S3Ch carries a single cysteine in position 3, near the N terminus. 3xCh contains two additional cysteines, one in the luminal loop at position 106, and one in the stromal loop at position 160. The bacterially expressed proteins were labeled, subsequently reconstituted with pigments to form trimeric LHCII, and purified. As controls, the unlabeled proteins were reconstituted and purified.

The absorption spectra of both dye-labeled LHCII derivatives, S3Ch and 3xCh (Figs 1A and 1B, respectively), show a distinct absorption band at 573 nm, near the absorption maximum of Rhodamine Red in detergent solution (0.1% β -dodecylmaltoside) at 566 nm, in the middle of the green gap. The difference spectra between the dye-labeled and non-labeled complexes resemble the Rhodamine Red absorption spectra. As expected, in 3xCh with its 3 potential binding anchors, the contribution of the dye to the overall absorption is

higher than in S3Ch with its single cysteine. Assuming that the extinction coefficient of protein-bound Rhodamine Red is the same as the one in methanol solution, we calculated dye-protein ratios of 0.63 and 2.58 in S3Ch and 3xCh, respectively.

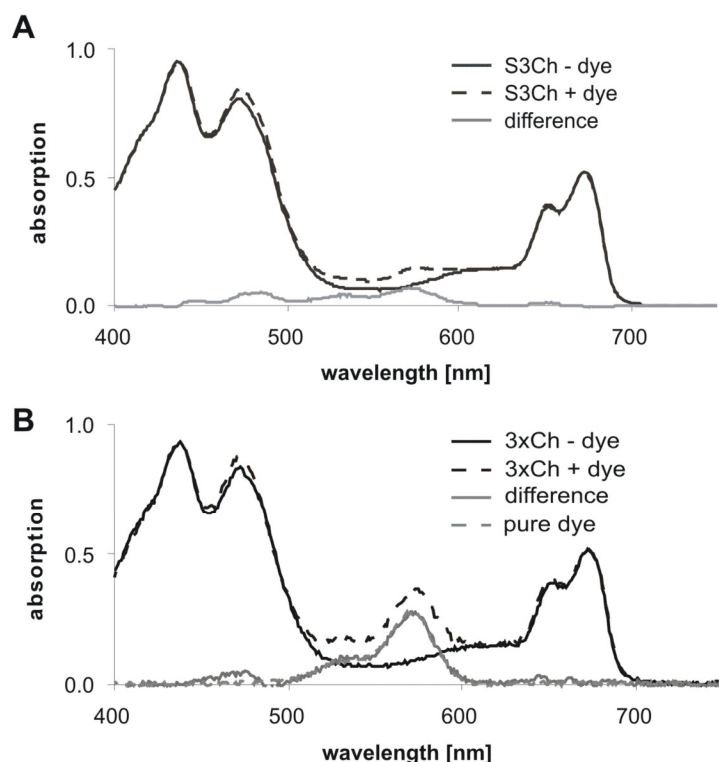


Figure 1: Labeling with Rhodamine Red partially fills the green gap in LHCII absorption. Absorption spectra of unlabeled (solid black line) and labeled LHCII (dashed black line) were normalized at 670 nm. Difference spectra (solid grey line) were calculated, pure Rhodamine Red (dashed grey line in Fig. 1B) is normalized to the difference spectra. (A) S3Ch, (B) 3xCh.

Covalent binding of Rhodamine Red to LHCII was verified by denaturing the complex using the strong detergent sodium dodecyl sulfate and analyzing the protein component by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. The protein bands of the labeled but not of

the unlabeled complexes exhibited fluorescence (not shown). The specificity of Rhodamine Red maleimide attachment to cysteines was confirmed by a control experiment using the LHCII derivative C79S containing no cysteine; the apparent dye/protein ratio obtained with this protein was less than 10% (not shown).

Contribution of Rhodamine Red to LHCII absorption does not necessarily imply that the dye is able to add to the light-harvesting function of the complex. Therefore, we measured excitation spectra with the detection wavelength set to 680 nm, the emission wavelength of Chl *a*. As seen in Fig. 2, the contribution of the dye to the excitation spectra is about the same as that to the absorption spectra. Only a small part of that is due to emission of Rhodamine Red itself at 680 nm, since a control measurement with an aqueous solution of Rhodamine Red at the concentration as in the corresponding labeled LHCII samples yields only a small excitation signal. Thus, Fig. 2 demonstrates that Rhodamine Red excitation stimulates Chl *a* emission at 680 nm. Consequently, the dye is able to transfer its excitation

energy efficiently to Chl *a* and thus contributes to the absorption cross section of the light-harvesting unit.

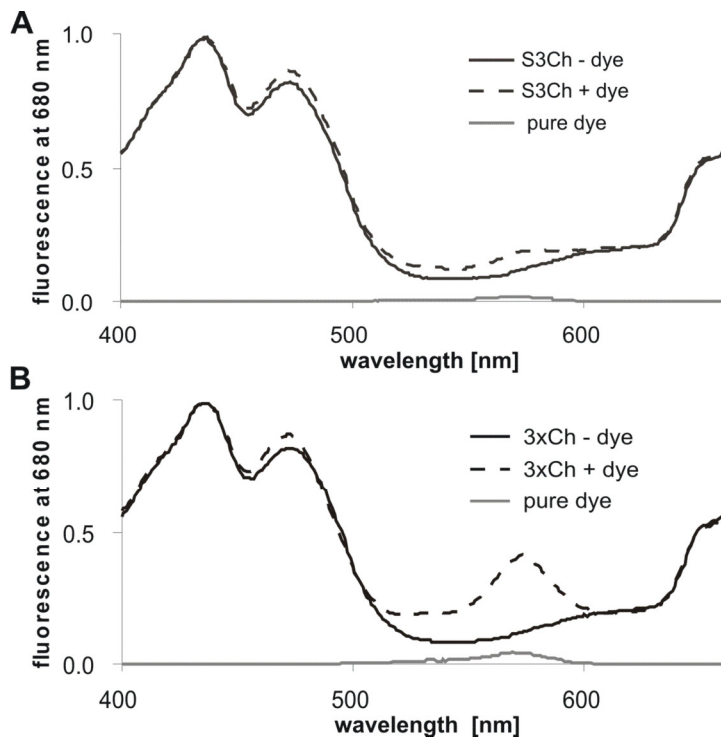


Figure 2: Labeling with Rhodamine Red fills the green gap in the LHCII excitation spectrum. Excitation spectra ($\lambda_{\text{em}} = 680 \text{ nm}$) of LHCII trimers with (dashed black line) and without (solid black line) Rhodamine Red. Spectra were normalized at 437 nm; absorption of LHCII never exceeded 0.05. Spectra of pure dye (grey line) were measured in the same buffer and had the same concentration as calculated for the labeled samples by absorption difference spectra. (A) S3Ch, (B) 3xCh.

Donor quenching is nearly 100%

If a fluorophor transfers its energy to an acceptor, its emission (donor emission) is quenched. This effect can be used to quantitate fluorescence resonance energy transfer (FRET). Figure 3 shows the fluorescence emission spectra of the donor Rhodamine Red in aqueous solution (solid grey lines). Its concentration is the same as the dye concentration in a 37 nM solution of labeled S3Ch and 3xCh (Figs 3A and 3B, respectively). The excitation wavelength is 550 nm, near the absorption maximum of the dye. Unlabeled LHCII excited at this wavelength, emits some fluorescence (spectra indicated by the dark grey area in Figs 3A,B) since even in

the green gap LHCII shows some light absorption. When the labeled LHCII complexes are excited at the same wavelength (spectra indicated by the dashed areas), the donor emission at 573 nm disappears virtually completely, whereas Chl *a* emission at 680 nm is markedly enhanced. In the case of excitation energy transfer, the percentage of donor fluorescence quenched in the presence of the acceptor is a direct measure of the energy transfer efficiency, provided the fluorescence quantum yield of the donor is not altered by some other effect, for instance a change in the donor dye's environment. In fact, upon labeling CP29, another Chl *a/b*-containing light-harvesting protein, with the fluorescent dye TAMRA, the dye's fluorescence was partially quenched even in the absence of pigments, presumably due to the protein environment [35]. We compared the fluorescence emission of Rhodamine attached to the LHCII apoprotein with that of the dye bound to an 8-amino acid fragment resulting from protease treatment of the labeled protein. We observed no difference in Rhodamine fluorescence emission between these two environments (not shown), which

makes it unlikely that the environment in the pigmented protein has a large impact on the fluorescence quantum yield. Consequently, the energy transfer efficiency between Rhodamine and Chl, calculated from donor quenching amounts to 98% for S3Ch and 99% for 3xCh.

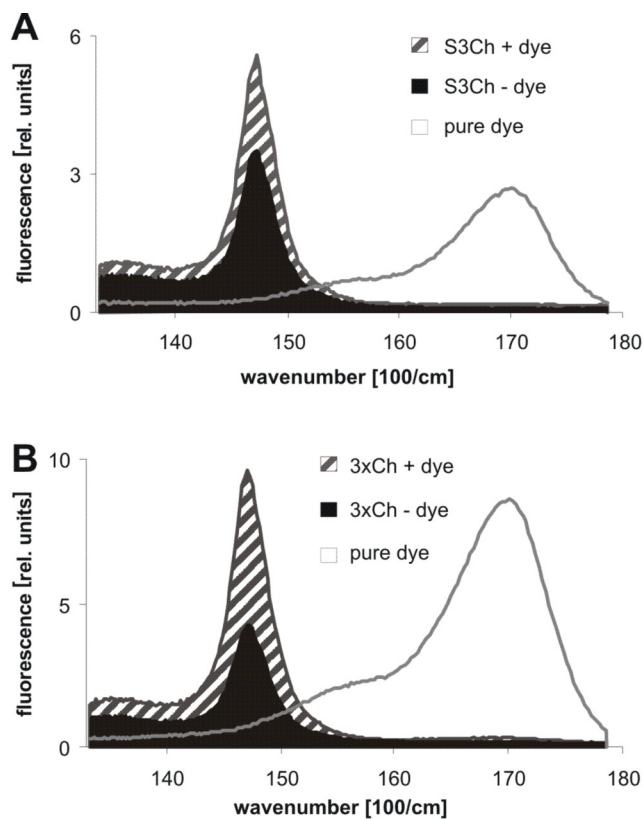


Figure 3: Energy transfer measurements. Emission spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 550 \text{ nm}$) of LHCII with (dashed area) and without (solid area) Rhodamine Red. Concentration of LHCII was always $37 \pm 3 \text{ nM}$. Spectra of pure dye (grey line) were measured in the same buffer and had the same concentration as calculated for the labeled samples by absorption difference spectra. (A) S3Ch, (B) 3xCh.

If in fact this quenching is due to energy transfer, then the sensitized acceptor emission, i.e. the extra acceptor emission seen only in the presence of the donor, should correspond to the quenched donor emission. If both donor and acceptor have the same fluorescence quantum yields ϕ_F then the disappearing area under the quenched donor spectrum (A_Q) should be same as the added area under the sensitized acceptor spectrum (A_S), with both spectra plotted against wavenumbers rather than wavelengths. If the ϕ_F values are not the same, then

$$A_S = [\varphi_F(\text{acceptor}) / \varphi_F(\text{donor})] * A_Q \quad (3)$$

With φ_F (Rhodamine Red) = 0.5 and φ_F (LHCII) = 0.2 (see Materials and Methods), A_S should be $0.4 * A_Q$. The ratios A_S/A_Q taken from Fig. 3, 0.42 for S3Ch and 0.34 for 3xCh, are in good agreement with the expected values. We conclude that in Rhodamine Red-labeled S3Ch and 3xCh, the dyes transfer their excitation energy to the Chls at an efficiency of 98% and 99%, respectively.

Labeling does not significantly affect the fluorescence quantum yield, structure, pigment binding, and stability of LHCII.

If dye-labeled LHCII is to be used as an improved light harvester, then it is essential that labeling does not reduce the fluorescence quantum yield of the Chls in LHCII or the structure or stability of the complex. To compare the Chl fluorescence quantum yields of labeled and non-labeled LHCII, the emission spectra of complex solutions were measured with the excitation wavelength set to 470 nm where Chl *b* absorbs efficiently whereas Chl *a* and Rhodamine Red absorb to a much lesser extent. In properly assembled LHCII, Chl *b* transfers its excitation energy entirely to Chl *a* so that upon excitation of Chl *b*, emission occurs only from Chl *a* at 680 nm but not from Chl *b* at 660 nm. The integrated intensities of labeled and non-labeled LHCII, all at a concentration of 37 nM, were the same within $\pm 4\%$

and no shoulder at 660 nm was seen (not shown). Therefore, the presence of the dye significantly affects neither the quantum yields of Chls in LHCII nor the ability of Chl *b* to transfer its excitation energy to Chl *a*.

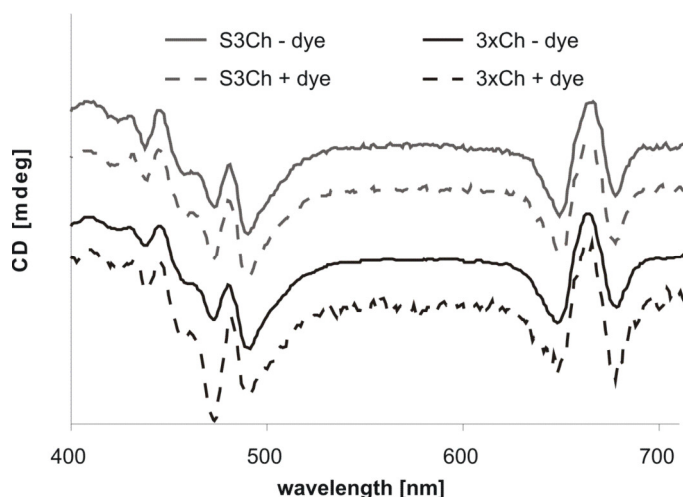


Figure 4: Protein folding and trimerization is not affected by labeling. CD spectra of labeled (dashed line) and unlabeled (solid line) LHCII. Spectra were normalized at 490 nm; grey: S3Ch, black: 3xCh.

Proper folding and assembly with pigments of the labeled LHCII apoprotein to yield the authentic LHCII structure were further tested by comparing the CD spectra in the visible domain of labeled complexes with those of the non-labeled ones (Fig. 4). The CD signals of LHCII are due to a multitude of pigment-pigment interactions [36] and can therefore be used as a fingerprint of the correctly assembled pigment-protein complex. The CD spectra of the unlabeled LHCII versions were very similar to that of wild type LHCII [27]. Most features in the CD signals of labeled LHCII were also identical except the negative band at 470 nm. This

band was somewhat more prominent in labeled S3Ch and significantly enhanced in labeled 3xCh.

Pigment binding of the samples was tested by butanol extraction and HPLC analysis. Determined stoichiometries were calculated on a 2 lutein basis as proper occupation of the lutein binding sites is essential for a stable LHCII [37]. All pigment-protein complexes in this study exhibited similar stoichiometries (Table 1). Total Chl levels for all samples were between 13.6 and 14.2 with a Chl *a/b* ratio of 1.19 (unlabeled S3Ch) to 1.31 (labeled 3xCh). Neoxanthin (Neo) as the only carotenoid bound besides lutein amounted to 0.79 ± 0.05 per 2 luteins. These data match with pigment stoichiometries of other recombinant LHCII [38] and no significant differences were detected between the two LHCII mutants or between labeled and unlabeled complexes.

The thermal stability of labeled and unlabeled LHCII versions was tested by measuring its temperature-dependent dissociation, monitored by the negative CD signal at 492 nm. This CD band disappears when monomeric LHCII falls apart [39]. Figure 5 shows the “melting curve” of labeled 3xCh; data from S3Ch and both non-labeled LHCII versions were very similar. Below 25 °C and above 75 °C the CD signal at 492 nm showed no temperature dependence. The inflection points of the fitted curves were taken as the “melting

temperature”. This temperature was within the range of (60.8 ± 0.6) °C for all four samples, indicating that labeling LHCII with up to three Rhodamine Red dyes did not significantly affect complex stability (Table 2).

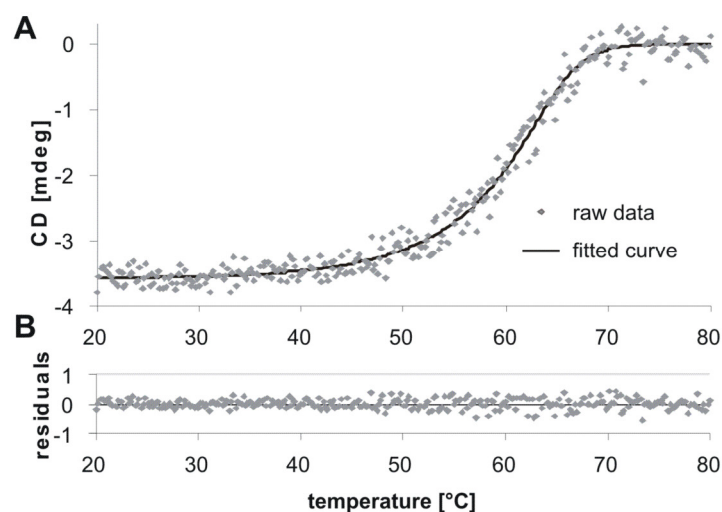


Figure 5: Labeling has no influence on thermal stability. (A) $CD_{492 \text{ nm}}$ trace during a temperature gradient of labeled 3xCh together with a fitted curve (solid line), (B) residuals of fitted curve.

Discussion

Energy transfer mechanism

The Rhodamine Red-labeled LHCII derivatives presented here exhibit nearly 100% donor (Rhodamine) quenching and an approximately equivalent amount of sensitized acceptor (Chl) fluorescence. Taken together, this strongly suggests energy transfer between the chromophores. The closest distance between the Ca atom of the labeling positions and a Chl

is 9.3 Å (S160 to Chl 11, [12]), which is beyond van-der-Waals distances. Therefore, energy transfer presumably follows the Förster FRET mechanism [40]. The estimated distances between Rhodamine dyes in positions 106 and 160 and the nearest Chl are 2.4 nm to Chl 14, and 1.9 nm to Chl 11, respectively (position 3 is not resolved in the crystal structure). These distances are much shorter than the critical Förster distances R_0 (4.7 nm and 4.6 nm for energy transfer to Chl *a* and Chl *b*, respectively). Therefore, Förster energy transfer efficiencies between 97.5 and 99.5% are expected. This is still a lower limit since only the nearest Chl to each dye is taken into account. Actually, each donor dye can transfer its excitation energy to a number of acceptor Chls which will make energy transfer even more efficient.

The sensitized acceptor emission matches donor quenching in reasonable approximation. The slight difference is most likely due to an imprecision in the parameters to be taken into account.

Impact of labeling on LHCII folding and stability

It is remarkable that LHCII can accommodate three bound chromophores without its structure or stability being significantly affected. This has been shown by the energy transfer between Chls and the thermal disintegration staying unchanged upon labeling. The CD spectrum of the triple-labeled LHCII, too, shows all the peaks characteristic for LHCII trimers [27]. The only difference between labeled and unlabeled complexes is the enhanced negative band at 473 nm. This signal increase has been observed upon the loss of bound Neo [36; 41; 42; 43]. However the pigment stoichiometries measured show no pigment loss, including Neo, upon Rhodamine Red labeling. Minor structural changes have been suggested to be able to alter this CD signal [36]. Such minor structure rearrangements may also be responsible for the slight changes observed in the absorption around 470 nm of labeled samples. Similarly, amino acid exchanges in the luminal loop of LHCII have been shown to affect the negative CD band at 473 nm as well as the absorption around 470 nm without significantly affecting the Neo stoichiometry, possibly by slightly altering the arrangement or environment of Neo [44]. Rhodamine Red in position 106 would be the most likely candidate for exhibiting a similar effect on Neo.

Labeling efficiencies

In this study we used LHCII mutants with one or three cysteines exhibiting dye-protein ratios of 0.63 and 2.58 respectively. Since all labeling positions are in loop or terminal regions, they should be readily accessible to the reactive dyes and, therefore, be labeled at a high efficiency. One possible reason for incomplete labeling is electrostatic repulsion between dye and protein. Rhodamine Red has a positive charge delocalized over the conjugated system,

and especially the cysteine in position 3 has positive charges in close proximity, namely Arg1 and Lys2. In fact, labeling of this position in S3Ch is only 63% efficient. If in the triple-labeled protein, too, only about 2/3 of the cysteines in position 3 bind a dye, then the total dye:protein ratio of 2.58 implies that the remaining two positions are virtually completely labeled.

If the triple-labeled protein 3xCh had the full 3:1 ratio of dye:protein, then the expected contribution of Rhodamine Red to the light-harvesting efficiency of LHCII would be some 15% higher than the one obtained in this work. A larger increase in efficiency would be expected if additional donor dyes would be introduced into LHCII. The additional labeling sites would have to be in exposed regions of the LHCII protein so as to minimize the risk of the dye interfering with the LHCII pigment-protein structure. Moreover, the labeling sites should have some distance to one another to avoid close interaction between the dyes that may lead to dissipation of excitation energy. We have added a fourth cysteine anchor near the C-terminus of the LHCII protein. The quadruple-labeled protein was fully active in its reconstitution with pigments; however, trimerization of the complex was significantly impaired. Since structural changes in the C-terminal domain have been known to interfere with trimer formation of LHCII [45], this disturbance may be attributed to the fourth label itself and not to the fact that as many as four fluorophores are bound to the complex. Therefore, the possibility is still open to increase the light-harvesting efficiency of LHCII by more than three dyes without any negative impact on its structure or function.

Conclusion

In this study we present a hybrid structure of organic dye molecules and a biological protein. Up to three Rhodamine Red molecules covalently bound to each LHCII apoprotein contribute to LHCII absorption in its green gap without significantly affecting the structure or stability of trimeric LHCII. This construct may therefore be useful for biomimetic light-harvesting in photovoltaic and other applications. LHCII is not photostable under long-term exposure to strong light and the cost of its production in the laboratory is rather high; this limits its usefulness on a technical scale. On the other hand, its capacity of self-organization and, thus, self-repair may make up for some of these obstacles.

Acknowledgement

We thank the Volkswagen Foundation (Germany, I/82 072-074) for financial support.

References

- [1] D. A. LaVan, J. N. Cha, Approaches for biological and biomimetic energy conversion, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103 (2006), 5251–5255.
- [2] J. Lee, E. Greenbaum, Bioelectronics and biometallocatalysis for production of fuels and chemicals by photosynthetic water splitting, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51-2 (1995), 295–305.
- [3] R. Das, P. Kiley, M. Segal, J. Norville, A. Yu, L. Wang, S. Trammell, L. Reddick, R. Kumar, F. Stellacci, N. Lebedev, J. Schnur, B. Bruce, S. Zhang, M. Baldo, Integration of photosynthetic protein molecular complexes in solid-state electronic devices, *Nano Lett.* 4 (2004), 1079–1083.
- [4] B. O'Regan, M. Grätzel, A low-cost, high-efficiency solar cell based on dye-sensitized colloidal TiO₂ films, *Nature* 353 (1991), 737–740.
- [5] R. J. Cogdell, A. T. Gardiner, H. Hashimoto, T. H. P. Brotsudarmo, A comparative look at the first few milliseconds of the light reaction of photosynthesis, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7 (2008), 1150–1158.
- [6] C. Siegers, U. Würfel, M. Zistler, H. Gores, J. Hohl-Ebinger, A. Hinsch, R. Haag, Overcoming kinetic limitations of electron injection in the dye solar cell via coadsorption and FRET, *Chem. Phys. Chem.* 9 (2008), 793–798.
- [7] T. S. Balaban, Tailoring porphyrins and chlorins for self-assembly in biomimetic artificial antenna systems, *Acc. Chem. Res.* 38 (2008), 612–623.
- [8] Y. Suemori, M. Nagata, Y. Nakamura, K. Nkagawa, A. Okuda, J.-i. Inagaki, K. Shinohara, M. Ogawa, Iida Kouji, T. Dewa, K. Yamashita, A. Gardiner, R. J. Cogdell, M. Nango, Self-assembled monolayer of light-harvesting core complexes of photosynthetic bacteria on an amino-terminated ITO electrode, *Photosynth. Res.* 90 (2006), 17–21.
- [9] S. Mackowski, S. Wörmke, A. J. Maier, T. H. P. Brotsudarmo, H. Harutyunyan, A. Hartschuh, A. O. Govorov, H. Scheer, C. Bräuchle, Metal-enhanced fluorescence of chlorophylls in single light-harvesting complexes, *Nano Lett.* 8 (2008), 558.
- [10] H. Wolf-Klein, C. Kohl, K. Müllen, H. Paulsen, Biomimetic model of a plant photosystem consisting of a recombinant light-harvesting complex and a terrylene dye, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002), 3380–3382.
- [11] J. Liu, R. Lauterbach, H. Paulsen, W. Knoll, Immobilization of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex (LHCIIb) studied by surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy, *Langmuir* 24 (2008), 9661–9667.
- [12] R. Standfuss, A. C. T. van Scheltinga, M. Lamborghini, W. Kühlbrandt, Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution, *EMBO J.* 24 (2005), 919–928.
- [13] G. S. Beddard, G. Porter, Concentration quenching in chlorophyll, *Nature* 260 (1976), 366–376.
- [14] G. A. Montano, B. P. Bowen, J. T. LaBelle, N. W. Woodbury, V. B. Pizziconi, R. E. Blankenship, Characterization of *Chlorobium tepidum* chlorosomes: A calculation of bacteriochlorophyll *c* per chlorosome and oligomer modeling, *Biophys. J.* 85 (2003), 2560–2565.
- [15] T. Balaban, A. Holzwarth, K. Schaffner, G. Boender, H. Degroot, CP-MAS C-13-NMR dipolar correlation spectroscopy of C-13-enriched chlorosomes and isolated bacteriochlorophyll *c* aggregates of *Chlorobium tepidum*: The self-organization of pigments is the main structural feature of chlorosomes, *Biochemistry* 34 (1995), 15259–15266.

- [16] K. Kosemund, I. Geiger, H. Paulsen, Insertion of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein into the thylakoid - Topographical studies, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000), 1138–1145.
- [17] A. A. Pascal, Z. F. Liu, K. Broess, B. van Oort, H. van Amerongen, C. Wang, P. Horton, B. Robert, W. R. Chang, A. Ruban, Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting, *Nature* 436 (2005), 134–137.
- [18] T. Barros, A. Royant, J. Standfuss, A. Dreuw, W. Kühlbrandt, Crystal structure of plant light-harvesting complex shows the active, energy-transmitting state, *EMBO J.* 28 (2008), 298–306.
- [19] V. Razinkov, E. Sorokin, G. Bobylev, J. Molotkovsky, Rhodamine lipid derivatives increase the light-harvesting ability of isolated chloroplasts, *Biol. Membrany* 11 (1994), 660–663.
- [20] C. Röger, M. G. Müller, M. Lysetska, A. R. Holzwarth, F. Würthner, Efficient energy transfer from peripheral chromophores to the self-assembled zinc chlorin rod antenna: A bioinspired light-harvesting system to bridge the "green gap", *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006), 6542–6543.
- [21] A. R. Cashmore, Structure and expression of a pea nuclear gene encoding a light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding polypeptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984), 2960–2964.
- [22] G. Jeschke, A. Bender, T. Schweikardt, G. Panek, H. Decker, H. Paulsen, Localization of the N-terminal domain in light-harvesting chlorophyll *a/b* protein (LHCIIb) by electron paramagnetic resonance (EPR) measurements, *J. Biol. Chem.* 280 (2005), 18623–18630.
- [23] H. Paulsen, U. Rümmler, W. Rüdiger, Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein overexpressed in *E. coli*, *Planta* 181 (1990), 204–211.
- [24] P. Booth, H. Paulsen, Assembly of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex in vitro. Time-resolved fluorescence measurements, *Biochemistry* 35 (1996), 5103–5108.
- [25] H. Paulsen, B. Finkenzeller, N. Kühlein, Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein, *Eur. J. Biochem.* 215 (1993), 809–816.
- [26] C. Yang, R. Horn, H. Paulsen, The light-harvesting chlorophyll *a/b* complex can be reconstituted in vitro from its completely unfolded apoprotein, *Biochemistry* 42 (2003), 4527–4533.
- [27] S. Hobe, S. Prytulla, W. Kühlbrandt, H. Paulsen, Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll *a/b* complex, *EMBO J.* 13 (1994), 3423–3429.
- [28] P. J. G. Butler, W. Kühlbrandt, 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 (1988), 3797–3801.
- [29] T. Martinson, F. Plumley, One-step extraction and concentration of pigments and acyl lipids by sec-butanol from in vitro and in vivo samples, *Anal. Biochem.* 228 (1995), 123–130.
- [30] K. Peneva, G. M. Mihov, F. Nolde, S. Rocha, J.-i. Hotta, K. Baeckmans, J. Hofkens, H. Uji-i, A. Herrmann, K. Müllen, Water-soluble monofunctional perylene and terrylene dyes: Powerful labels for single-enzyme tracking, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008), 3372–3375.
- [31] J. H. Brannon, D. Magde, Absolute quantum yield determination by thermal blooming - Fluorescein, *J. Biol. Chem.* 82 (1978), 705–709.
- [32] J. R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, Springer, New York, 1999.

- [33] K. Sauer, H. Scheer, P. Sauer, Förster transfer calculations based on crystal structure data from *Agmenellum quadruplicatum* C-phycocyanin, *Photochem. Photobiol.* 46 (1987), 427–440.
- [34] N. Guex, M. Peitsch, SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis* 18 (1997), 2714–2723.
- [35] B. van Oort, S. Murali, E. Wientjes, R. B. . Koehorst, R. B. Spruijt, A. van Hoek, R. Croce, H. van Amerongen, Ultrafast resonance energy transfer from a site-specifically attached fluorescent chromophore reveals the folding of the N-terminal domain of CP29, *Chem. Phys.* 357 (2009), 113–119.
- [36] S. Georgakopoulou, G. van der Zwan, R. Bassi, R. van Grondelle, H. van Amerongen, R. Croce, Understanding the changes in the circular dichroism of light harvesting complex II upon varying its pigment composition and organization, *Biochemistry* 46 (2007), 4745–4754.
- [37] S. Hobe, H. Niemeier, A. Bender, H. Paulsen, Carotenoid binding sites in LHCIIb - Relative affinities towards major xanthophylls of higher plants, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000), 616–624.
- [38] J. Standfuss, W. Kühlbrandt, The three isoforms of the light-harvesting complex II - Spectroscopic features, trimer formation, and functional roles, *J. Biol. Chem.* 279 (2004), 36884–36891.
- [39] C. H. Yang, S. Boggasch, W. Haase, H. Paulsen, Thermal stability of trimeric light-harvesting chlorophyll *a/b* complex (LHCIIb) in liposomes of thylakoid lipids, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006), 1642–1648.
- [40] J. N. Miller, Fluorescence energy transfer methods in bioanalysis, *Analyst* 130 (2005), 265–270.
- [41] S. Hobe, I. Trostmann, S. Raunser, H. Paulsen, Assembly of the major light-harvesting chlorophyll-*a/b* complex - thermodynamics and kinetics of neoxanthin binding, *J. Biol. Chem.* 281 (2006), 25156–25166.
- [42] C. Liu, Y. Zhang, D. Cao, Y. He, T. Kuang, C. Yang, Structural and functional analysis of the antiparallel strands in the lumenal loop of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex of photosystem II (LHCIIb) by site-directed mutagenesis, *J. Biol. Chem.* 283 (2008), 487–495.
- [43] R. Croce, S. Weiss, R. Bassi, Carotenoid-binding sites of the major light-harvesting complex II of higher plants, *J. Biol. Chem.* 274 (1999), 29613–29623.
- [44] C. Yang, P. Lambrev, Z. Chen, T. Javorfi, A. Z. Kiss, H. Paulsen, G. Garab, The negatively charged amino acids in the lumenal loop influence the pigment binding and conformation of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta* 1777 (2008), 1463–1470.
- [45] A. Kuttkat, A. Hartmann, S. Hobe, H. Paulsen, The C-terminal domain of light-harvesting chlorophyll-*a/b*-binding protein is involved in the stabilisation of trimeric light-harvesting complex, *Eur. J. Biochem.* 242 (1996), 288–292.

1.2.1.4 Markierung von 4xCh mit verschiedenen Farbstoffen

Durch die Markierung von 3xCh mit Rho-Mal konnte die Grünlücke relativ effizient gefüllt werden. Da die Komplexe trotz der drei kovalent gebundenen Farbstoffe auch biochemisch erstaunlich stabil waren und die Proteinstruktur nicht beeinflusst schien, wurde im Weiteren versucht einen vierten Farbstoff an den LHCII zu binden. Dadurch sollte zum einen die Grünlücke noch effizienter gefüllt, zum anderen die biochemische Stabilität der Komplexe auf die Probe gestellt werden. Die Versuche wurden mit 4xCh durchgeführt, welcher neben den drei im 3xCh vorhandenen Cysteinen noch ein viertes im C-Terminus an der Position 223 besitzt.

Zunächst erfolgte die Markierung am Apoprotein nach der Standardmethode mit den drei Maleimid-funktionalisierten Farbstoffen PDI-Mal, Rho-Mal und DY731. Die an die Trimerisierung anschließende Ultrazentrifugation ergab in allen Fällen die typische Aufteilung in freies Pigment, Monomere und Trimere (Abb. 3.1.17 A). Auffallend war im Vergleich zur unmarkierten Kontrolle eine verstärkt diffuse Monomerbande, die im Fall von Rho-Mal nicht die übliche grüne sondern eine rot-braune Färbung aufwies. Weiterhin zeigte sich bei den markierten Proben eine stark verringerte Trimerausbeute. Ergab die Markierung mit PDI-Mal noch eine deutliche, wenn auch im Vergleich zur unmarkierten Kontrolle geringer konzentrierte, Trimerbande, zeigten sich bei Rho-Mal und DY731 markierten Proben nur noch sehr geringe Trimer Mengen.

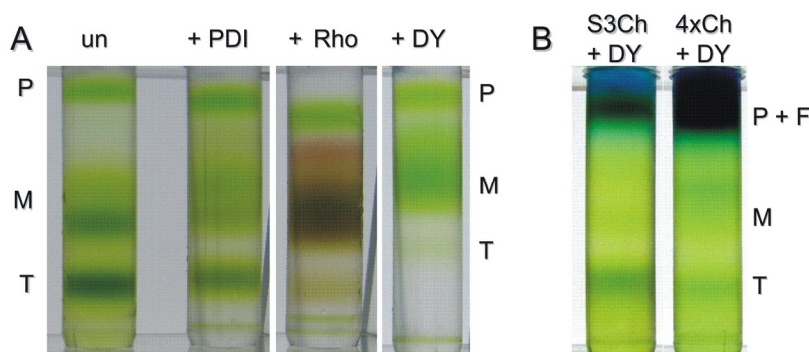


Abb. 3.1.17 Auftrennung von verschiedenen 4xCh Markierungen durch Ultrazentrifugation.

A) UZ-Auftrennung von 4xCh nach Markierung am Apoprotein, standardmäßiger Rekonstitution und Trimerisierung, un – unmarkierte Probe, +PDI/+Rho/+DY – Markierung mit PDI-Mal/Rho-Mal/DY731,

B) UZ Auftrennung von Trimeren nach Markierung des Ni-Säuleneluats, P – freies Pigment, F – freier Farbstoff, M – Monomere, T – Trimere, Daten wurden im Rahmen der Diplomarbeiten von Sabine Wiegand und Mara Werwie erhoben (Wiegand, 2008, Werwie, 2009).

Die Markierung mit DY731 erfolgte auch anhand des neuen, veränderten Protokolls. So wurde der LHCII zuerst rekonstituiert und trimerisiert, die Markierung erfolgte dann am Ni-Säuleneluat vor der aufreinigenden Ultrazentrifugation. Der überschüssige Farbstoff war zum Großteil auf Höhe des freien Pigmentes als blaue Färbung wiederzufinden (Abb. 3.1.17 B). Die Markierung von DY731 ergab zwar auch hier eine im Vergleich zur Markierung mit S3Ch geringer konzentrierte Trimerbande, diese war jedoch deutlich stärker als beim gleichen Versuchsansatz nach dem herkömmlichen Protokoll.

Jede dieser Trimerbanden wurde bei Wiegand (2008) und Werwie (2009) ausführlich charakterisiert und enthielt trotz unterschiedlicher Proteinausbeuten korrekt gefaltete und zu großen Teilen markierte LHCII-Trimere. Hier soll im Weiteren nur auf den Energietransfer und die Grünlückenfüllung bei PDI-4xCh und Rho-4xCh eingegangen werden.

Die Markierungsausbeute von PDI-4xCh betrug laut Absorptionsspektren des Apoproteins 37% je Cystein (1,48 PDI-Moleküle pro Monomer). In diesen Komplexen wurde der Farbstoff zu 99% gequencht, wobei erstmals bei einer Markierung mit PDI-Mal auch eine, wenn auch geringfügige, sensibilisierte Akzeptorfluoreszenz zu beobachten war (Abb. 3.1.18 B). Wieder war demnach ein effektiver Energietransfer zu beobachten, jedoch war die Füllung der Grünlücke nicht nennenswert.

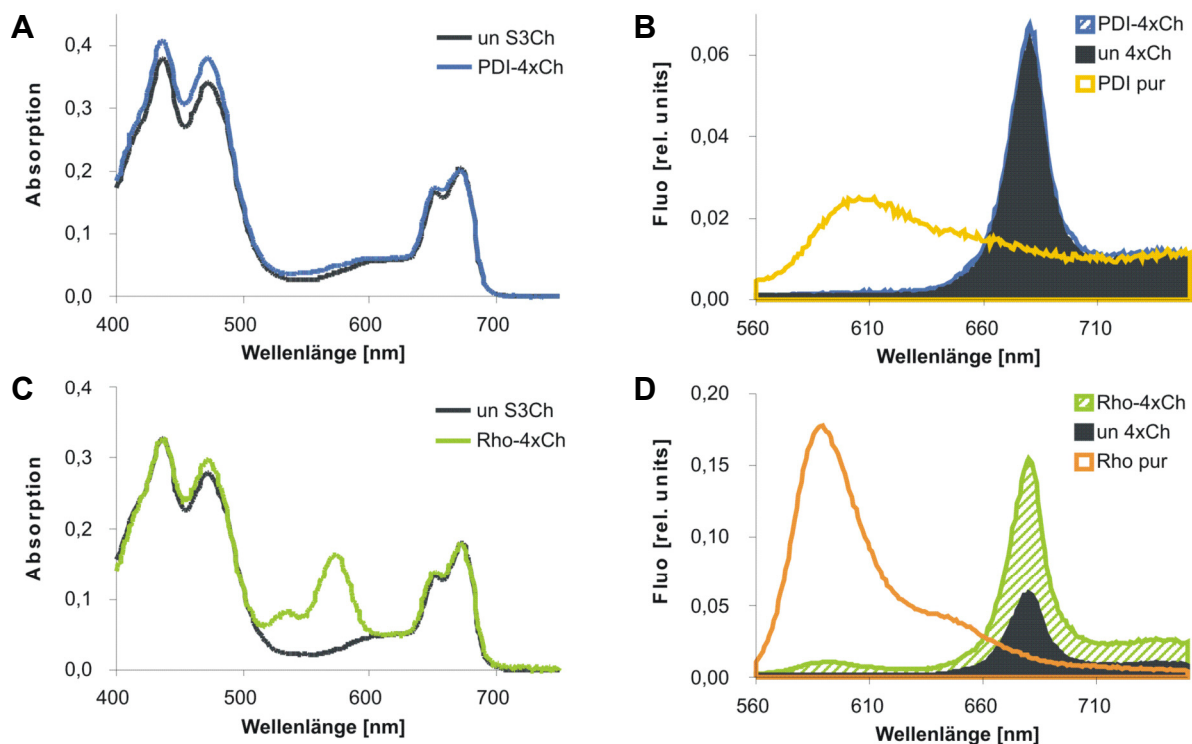


Abb. 3.1.18 Grünlückenfüllung und Energietransfer von PDI- und Rho-markierten 4xCh-Trimeren.

A+C) Absorptionsspektren von PDI-4xCh (A) und Rho-4xCh (B) im Vergleich zu unmarkiertem S3Ch (un S3Ch), Spektren bei 670 nm normiert, B+D) Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 550 \text{ nm}$) von PDI-4xCh (B) und Rho-4xCh (D) im Vergleich zu unmarkiertem 4xCh (un 4xCh) und freiem Farbstoff in derselben Konzentration wie in den markierten Proben (PDI pur bzw. Rho pur), LHCII Konzentration in allen Proben 37 nM, Daten von Mara Werwie im Rahmen ihrer Diplomarbeit erhoben (Werwie, 2009).

Absorptionsspektren von Rho-4xCh offenbarten ein sehr deutlichen Absorptionszugewinn zwischen 500 und 600 nm (Abb. 3.1.18 C). Das Maximum dieser Region war fast auf gleichem Niveau, wie das Maximum der Q_y -Region des LHCII-Anteils. Berechnungen zufolge waren in diesen Komplexen 78% der Cysteine mit Rho-Mal markiert. Dies entspricht 3,14 Rho-Molekülen pro Monomer. Obwohl in diesen Komplexen noch deutlich Rho-Fluoreszenz zu detektieren war, wurde die Farbstofffluoreszenz auch hier zum allergrößten Teil (94%)

gelöscht. Ähnlich wie bei Rho-3xCh konnte eine bedeutende sensibilisierte LHCII-Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 3.1.18 D). Das Maximum bei 680 nm war mehr als doppelt so intensiv wie in der unmarkierten Kontrolle. Der Flächenvergleich zwischen dem Verlust von Donorfluoreszenz zu Fluoreszenzzuwachs auf der Akzeptorseite ergab als Mittelwert von zwei Messungen einen Quotienten von 0,325. Der erwartete Wert lag bei 0,4 für eine Fluoreszenzquantenausbeute für Rho-Mal von 0,5 und für LHCII von 0,2.

Eine effektive Füllung der Grünlücke des LHCII konnte demnach durch die Markierung mit mehreren cysteinreaktiven Farbstoffen, genauer gesagt von 3xCh und 4xCh mit Rho-Mal, erreicht werden.

1.2.2 Markierungen mit aminoreaktiven Farbstoffen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch auf einem zweiten Weg versucht möglichst viele Farbstoffe an den LHCII zu binden und auf diese Weise die Grünlücke zu füllen. Dieser Weg beinhaltete die Markierung mit den aminoreaktiven Farbstoffen Perylen-N-Succinimidylester (PDI-NHS) und Rhodamin-N-Succinimidylester (Rho-NHS). Der LHCII besitzt zwölf Lysine, von denen sich sieben in den Termini und Loop-Regionen befinden. Bei der Markierung am Apoprotein würden potentiell alle Lysine markiert werden. Nicht nur die Anzahl der kovalent gebundenen Farbstoffe, auch die Lage in Helices oder Regionen, die für die Bindung der Cofaktoren wichtig ist, legen nahe, dass die native Faltung des markierten Proteins nicht mehr zustande kommen würde. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Markierung am gefalteten Komplex durchgeführt. Besonders die Entfernung des überschüssigen Farbstoffs sollte bei dieser Vorgehensweise entscheidend sein.

1.2.2.1 Optimierung der aminoreaktiven Markierungsreaktion

Für die Markierung von LHCII mit aminoreaktiven Farbstoffen wurden immer C3.2h-Trimere benutzt. Die Markierungsreaktion fand dabei an Komplexen statt, die durch Ultrazentrifugation aufgereinigt worden waren. Daher befanden sich standardmäßig Saccharose und LM im Reaktionsansatz. Zur Optimierung der Reaktion wurde die Reaktionsdauer, der pH-Wert, die Menge an Farbstoff und die Aufreinigung optimiert. In diesem Abschnitt soll jedoch nur auf die beiden ersten Punkte eingegangen werden, da sie sich auf die allgemeine Reaktion beziehen.

Die allgemeine Reaktion von aminoreaktiven Farbstoffen mit C3.2h-Trimeren wurde durch Auftrennung der markierten Komplexe in einer SDS-PAGE analysiert. Dabei wurde ein 20fach molarer Überschuss an PDI-NHS eingesetzt, das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von „Solid support“ und anschließender Zentrifugation, wodurch der noch freie Farbstoff aus dem Ansatz entfernt wurde (II6.3.4). Der pH-Wert wurde schon durch den

Puffer während der Ultrazentrifugation vorgegeben. Dabei wurde kein Tris-Puffer verwendet, da dieser auch Aminogruppen enthält, die mit dem Farbstoff reagieren können. Stattdessen wurde NaP- (pH 8,5) und Na-Borat-Puffer (pH 9,5) benutzt.

Nach einer SDS-PAGE konnte in allen Markierungsansätzen der LHCII durch Coomassiefärbung und Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden (Abb. 3.1.19). Das auch aufgetragene Apoprotein sowie die unmarkierte Kontrolle zeigten dagegen wie erwartet keine Fluoreszenz. Diese ging also eindeutig auf eine erfolgreiche aminoreaktive Markierung zurück. Obwohl sich in allen markierten Proben laut Coomassiefärbung unterschiedlich viel Protein befand, und demnach auch die Fluoreszenzsignale unterschiedlich stark waren, korrelierten die relativen Mengen. So befand sich beispielsweise in der Probe nach 60 min Inkubation sehr wenig Protein, dementsprechend war auch das Fluoreszenzsignal schwächer. Auffallend ist, dass schon nach „0“ min das Fluoreszenzsignal im Verhältnis zur aufgetragenen Proteinmenge dieselbe Stärke aufweist wie in den darauffolgenden Ansätzen. Die Probe konnte zwar nicht nach einer tatsächlichen Inkubationszeit von 0 min abgestoppt werden, da alleine die Zentrifugation schon 1 min dauerte, jedoch wurde der Farbstoff in den Ansatz gegeben, der schon den „Solid support“ enthielt, weshalb die Inkubationszeit minimal gehalten wurde. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Reaktion sehr schnell verläuft und die Reaktionszeit kaum einen Einfluss auf die Markierungsausbeute hatte.

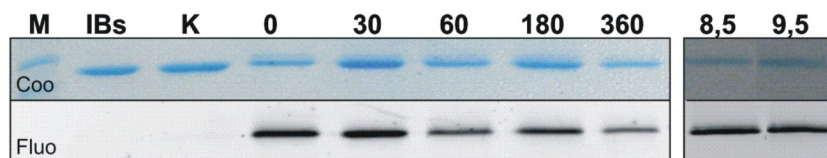


Abb. 3.1.19 Markierungsausbeuten nach Reaktion von C3.2h-Trimeren mit PDI-NHS unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.

Die markierten Komplexe wurden nach Aufreinigung durch SDS-PAGE aufgetrennt und sowohl über die Coomassiefärbung (Coo) als auch Fluoreszenzmessungen (Fluo) analysiert. M – Marker, IBs – unmarkiertes Apoprotein, K – unmarkierte Trimere, 0/30/60/180/360 – Reaktion bei pH 8,5 wurde nach 0, 30, 60, 180 bzw. 360 min gestoppt, 8,5/9,5 – Durchführung der Reaktion für 3 h bei pH 8,5 bzw. 9,5.

Um den nötigen pH-Wert der Reaktion zu bestimmen, wurden Versuche bei pH 8,5 und 9,5 durchgeführt. Je niedriger der pH während der Reaktion ist, desto mehr Lysine liegen protoniert vor. Diese können dann nicht mehr mit NHS-aktivierten Farbstoffen reagieren. So wird davon ausgegangen, dass bei pH 7,5 nur noch die Aminogruppe am N-Terminus potentiell reaktiv ist (vgl. Wolf-Klein, 2001). Bei höheren pH-Werten deprotonieren dagegen die Lysine, weshalb immer mehr von ihnen markiert werden können. Die Analyse der verschiedenen Reaktion durch SDS-PAGE ergab bei pH 8,5 und 9,5 bei gleichem Coomassiesignal, und damit gleicher Proteinmenge, ein Fluoreszenzsignal derselben Stärke. Damit ist davon auszugehen, dass eine weitere pH-Wert Erhöhung keine weiteren Lysine für aminoreaktive Farbstoffe zugänglich macht. Da eine Erhöhung des pH-Wertes im Gradienten

über 9 die Trimerausbeute reduziert (keine Abbildung), wurde im Folgenden standardmäßig die Reaktion für 3 Stunden mit NaP-Puffer bei pH 8,5 durchgeführt.

1.2.2.2 Charakterisierung der aminomarkierten LHCII-Trimere

Die aminomarkierten C3.2h-Trimere wurden nach der Aufreinigung spektroskopisch und biochemisch charakterisiert, um eine mögliche Beeinflussung der Proteinstruktur durch die kovalenten Farbstoffe zu untersuchen.

In Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) zeigte sich bei allen Komplexen ein einziges Maximum bei 680 nm (Abb. 3.1.20 A). Obwohl bei den markierten Proben im Vergleich zur unmarkierten Kontrolle ein stärkeres Signal bei 660 nm zu erkennen war, kann dieses nicht als auffällige Schulter bezeichnet werden. Daher wird von einem nahezu vollständigen Energietransfer innerhalb des LHCII ausgegangen. Auch in den CD-Spektren der markierten Komplexe zeigte sich im Vergleich zur unmarkierten Kontrolle keine signifikante Veränderung (Abb. 3.1.20 B).

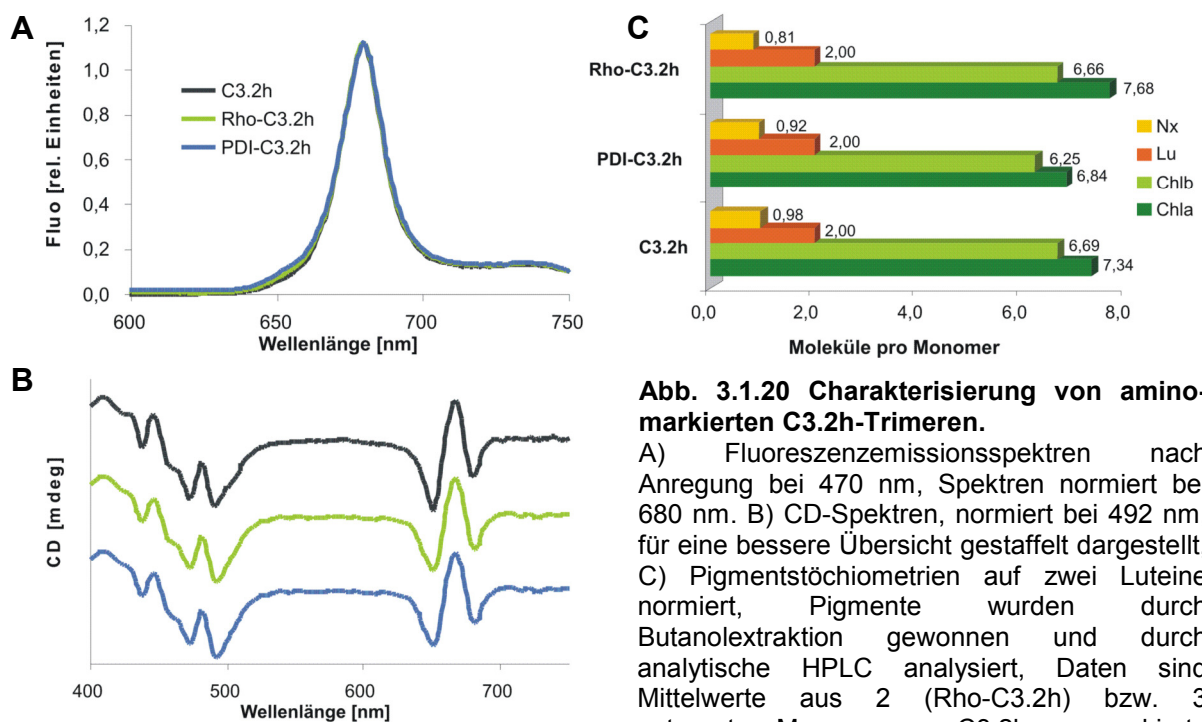


Abb. 3.1.20 Charakterisierung von aminomarkierten C3.2h-Trimern.

A) Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei 470 nm, Spektren normiert bei 680 nm. B) CD-Spektren, normiert bei 492 nm, für eine bessere Übersicht gestaffelt dargestellt. C) Pigmentstöchiometrien auf zwei Luteine normiert, Pigmente wurden durch Butanolextraktion gewonnen und durch analytische HPLC analysiert, Daten sind Mittelwerte aus 2 (Rho-C3.2h) bzw. 3 getrennten Messungen, C3.2h – unmarkierte Kontrolle.

Die Analyse der gebundenen Pigmente ergab nur geringfügige Unterschiede (Abb. 3.1.20 C). So hatte Rho-C3.2h durchschnittlich etwas weniger Nx gebunden als die beiden anderen Komplexe (0,81 statt 0,92 bzw. 0,98 Moleküle pro Monomer). Dagegen enthielt PDI-C3.2h weniger Chlorophylle (13 statt 14 bzw. 14,3 Molekülen pro Monomer).

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Temperaturstabilität der aminomarkierten Komplexe über das CD-Signal bei 492 nm in einem Temperaturgradienten gemessen (vgl. III.1.2). Dabei zeigten unmarkierter C3.2h und Rho-C3.2h einen ähnlichen Verlauf, welcher sich auch durch einen vergleichbaren Wendepunkt und damit „Zerfallstemperatur“ ausdrückt (Abb. 3.1.21). Diese liegt bei unmarkierten Komplexen bei 57,4°C, für Rho-C3.2h bei 55,8°C. Die Daten für PDI-C3.2h zeigten einen anderen Verlauf. Sie wurden daher nicht auf eine sigmoide Kurve angepasst. In Abb. 3.1.21 ist dagegen nur der geglättete Graph gezeigt. Auch hier fing das Signal bei etwas weniger als -3 mdeg an, es verringerte sich bis ungefähr 60°C auf einen Wert von -2,5 mdeg. Danach schien ein Plateau erreicht, welches erst ab über 70°C beendet wird. Ab hier stieg das Signal stark an, erreichte jedoch bis 80°C nicht 0. Dieser Verlauf wurde in mehreren unabhängigen Messungen beobachtet. Es konnte demnach kein vergleichender Wert zu Rho-C3.2h und unmarkiertem C3.2h ermittelt werden.

Zusammenfassend schien die Markierung mit Rho-NHS die Proteinstruktur des LHCII nicht zu verändern. Bei einer Markierung mit PDI-NHS konnten trotz sonstiger Unauffälligkeit bei der Temperaturstabilität ein deutlicher Unterschied beobachtet werden.

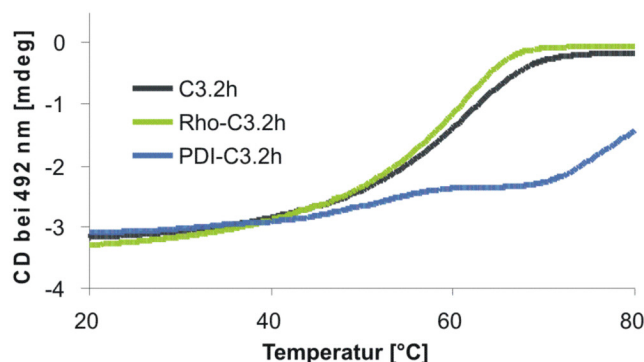


Abb. 3.1.21 Temperaturstabilität von aminomarkierten C3.2h-Trimeren.

Das CD-Signal bei 492 nm wurde kontinuierlich während eines Temperaturgradienten aufgenommen. Dargestellt sind die angepassten Graphen von unmarkiertem C3.2h (C3.2h) und markiertem Rho-C3.2h sowie PDI-C3.2h. Alle Proben hatten dieselbe LHCII-Konzentration.

Neben der Proteinstruktur der Komplexe war es auch interessant die Positionen der markierten Aminosäuren zu untersuchen. Dafür wurden die Trimere mit Trypsin verdaut und die so behandelten Proben durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.1.22). Da Trypsin im gefalteten Komplex nur die ersten acht Aminosäuren abspalten kann (vgl. III.1.2, Nußberger et al., 1993, Paulsen et al., 1993), ergibt sich auf diese Weise neben der Bestätigung, dass die Farbstoffe kovalent gebunden haben, die Möglichkeit einer groben Abschätzung der Anzahl der am N-Terminus und gesamt gebundenen Farbstoffmoleküle.

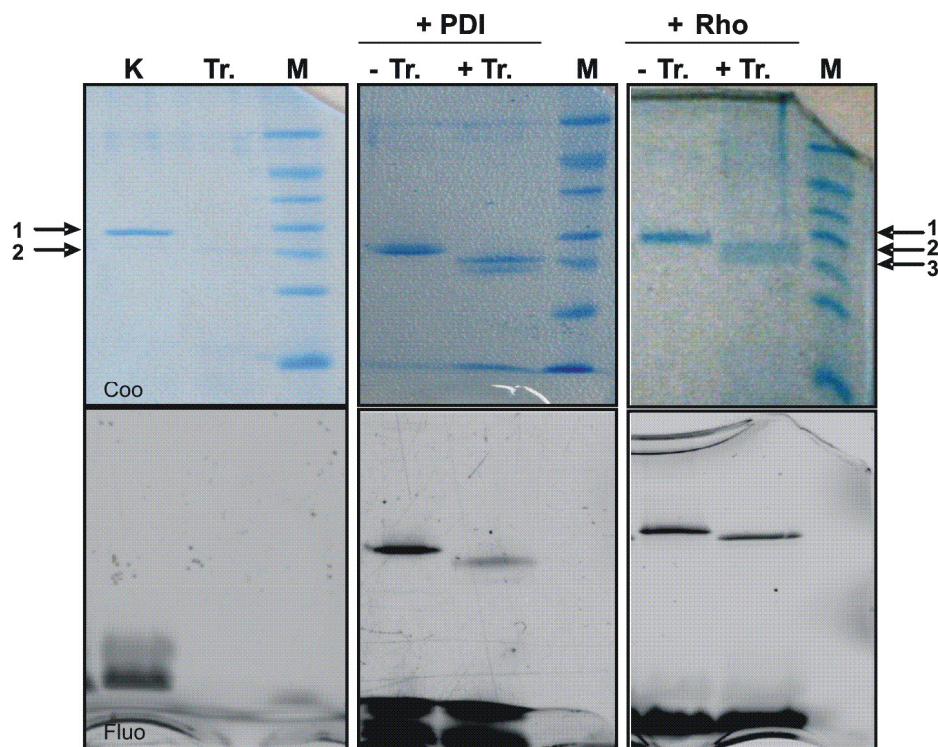


Abb. 3.1.22
Trypsinverdau mit
aminomarkierten
C3.2h-Trimeren.

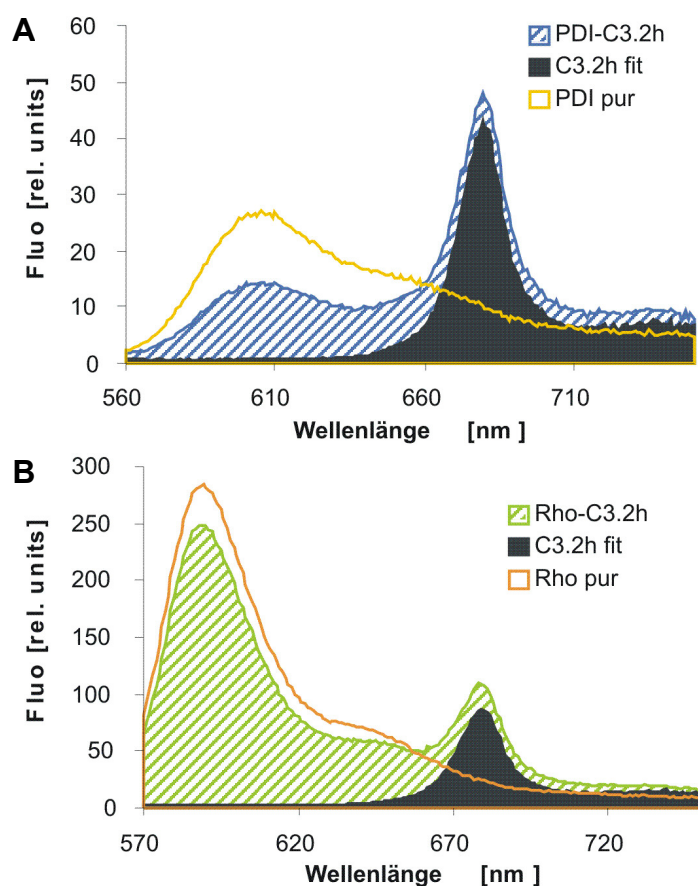
PDI- und Rho-
markierte Trimere
wurden mit Trypsin
(+Tr.) verdaut, durch
SDS-PAGE

aufgetrennt und durch Coomassie- (Coo) und Fluoreszenzsignal (Fluo) analysiert. Als Kontrolle wurden unverdaute Komplexe (-Tr.), nur Trypsin (Tr.) und unmarkierte C3.2h-Trimere, die mit denaturiertem Trypsin versetzt wurden (K) aufgetragen. 1 – unverdauter LHCII, 2 – Trypsin, 3 – verdauter LHCII.

Sowohl PDI-C3.2h als auch Rho-C3.2h zeigte durch die Coomassiefärbung auf Proteinebene das übliche Bandenmuster. Das unverdaute Protein lief auf Höhe der Kontrolle, während sich in der verdauten Probe zwei Banden zeigten, von der die höhere dem zugesetzten Trypsin, die untere dem verdauten Protein zugeschrieben wurde. Sowohl der unverdaute als auch der verdaute markierte LHCII zeigte auf Höhe der Proteinbanden ein Fluoreszenzsignal. Bei PDI-C3.2h war das verdaute Signal laut densitometrischer Auswertung um 65%, bei Rho-C3.2h um 35% schwächer als das des unverdauten Proteins. Demnach befanden sich bei PDI-C3.2h zwei Drittel, bei Rho-C3.2h ein Drittel der kovalent gebundenen Farbstoffe am N-Terminus.

1.2.2.3 Energietransfer und freier Farbstoff

Neben der Charakterisierung der aminomarkierten Komplexe war es für die Füllung der Grünlücke natürlich entscheidend, ob auch ein Energietransfer von den gebundenen Farbstoffen auf den LHCII stattfindet. Daher wurden Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei 550 nm, der optimalen Absorption der Farbstoffe, aufgenommen. Hierbei zeigte sich sowohl bei PDI-C3.2h als auch bei Rho-C3.2h neben der erwarteten LHCII-Fluoreszenz bei 680 nm auch ein deutliches Signal um 600 nm, welche von dem Farbstoff stammte (Abb. 3.1.1). Eine fast komplette Löschung der Donorfluoreszenz, wie er bei den cysteinreaktiven Farbstoffen zu beobachten war (vgl. III1.1.2 und III1.2.1.4), fand bei diesen



Hybridkomplexen demnach nicht statt. Der Vergleich mit freiem Farbstoff in derselben Konzentration wie bei den markierten Komplexen offenbarte jedoch dennoch eine Löschung der Donorfluoreszenz, diese betrug bei PDI-C3.2h 50%, bei Rho-C3.2h 13%.

Abb. 3.1.23 Energietransfer bei aminomarkierten C3.2h-Trimeren.

Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei 550 nm von PDI-C3.2h (A) und Rho-C3.2h (B), als Vergleich dient jeweils der freie Farbstoff in derselben Konzentration wie bei der markierten Probe (PDI pur bzw. Rho pur), außerdem wurde noch der durch Dekonvolution bestimmte LHCII-Anteil des Spektrums der markierten Probe angegeben (C3.2h fit).

Eine genauere Betrachtung des Energietransfers wurde an dieser Stelle nicht durchgeführt. Viel wichtiger erschien es die Ursache der geringen Löschung der Donorfluoreszenz zu ergründen. Eine Möglichkeit war, dass sich trotz der Aufreinigung nach der Markierungsreaktion noch freier Farbstoff in den Proben befand. Diese Aufreinigung erfolgte bei Rho-C3.2h durch Gelfiltration, bei PDI-C3.2h durch Zugabe von „Solid support“, welcher Aminogruppen trägt und somit mit dem freien Farbstoff reagiert. Dabei wurde in beiden Fällen die Aufreinigung mehrere Male wiederholt.

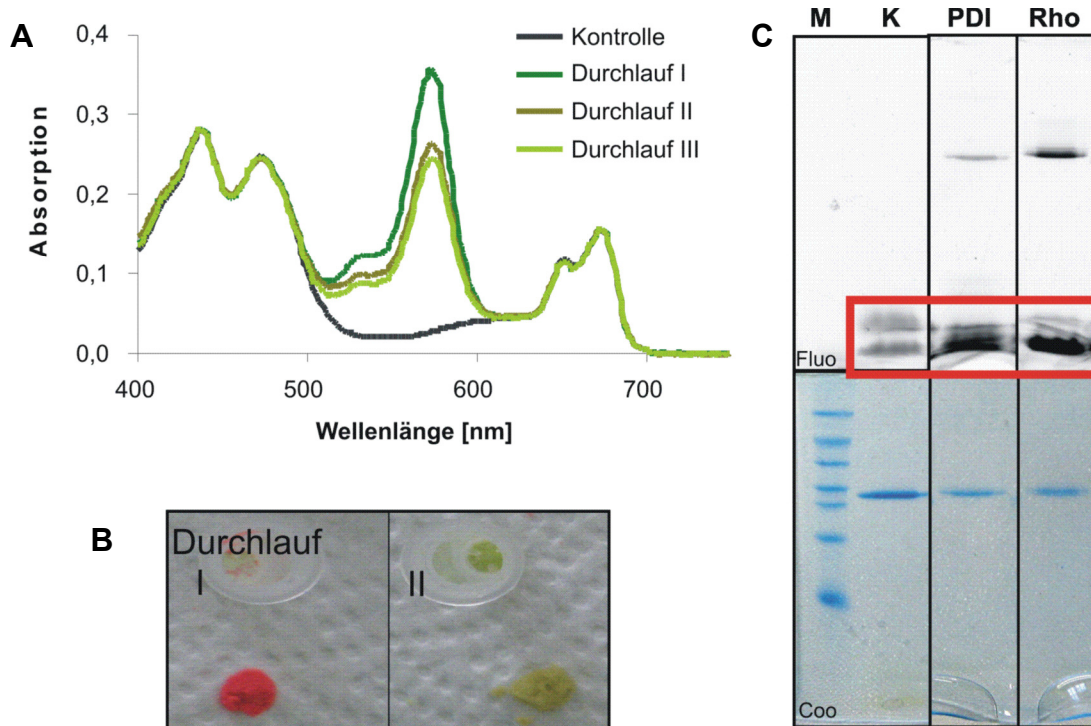


Abb. 3.1.24 Entfernung des überschüssigen Farbstoffs nach aminoreaktiver Markierung von C3.2h-Trimeren.

A) Absorptionsspektren von Rho-C3.2h nach 1-3 Gelfiltrationsaufreinigungen (Durchlauf I-III), als Kontrolle dienen unmarkierte C3.2h-Trimere (Kontrolle). B) „Solid support“ nach Zentrifugation des ersten (Durchlauf I) bzw. zweiten (II) Aufreinigungsprozesses von PDI-C3.2h. C) SDS-PAGE der mehrfach aufgereinigten Trimere, analysiert durch Fluoreszenz- (Fluo) und Coomassiesignal (Coo), M – Marker, K – unmarkierte C3.2h Trimere, PDI/Rho – PDI- bzw. Rho-C3.2h.

Der Erfolg der Farbstoffentfernung bei Rho-C3.2h wurde durch Aufnahme von Absorptionsspektren verfolgt (Abb. 3.1.24 A). Hier zeigte sich nach dem zweiten Durchlauf eine deutliche Abnahme der Absorption zwischen 500 und 600 nm. Dies zeigte, dass sich auch nach einmaliger Gelfiltration immer noch freier Farbstoff in der Probe befand, welcher erst beim zweiten Durchlauf entfernt werden konnte. Eine dritte Filtration erbrachte nur noch eine vergleichsweise geringe Farbstoffabnahme, weshalb von einer gut aufgereinigten Probe ausgegangen wurde.

Der für die Aufreinigung von PDI-C3.2h benutzte „Solid support“ war bei dem ersten Durchgang stark rosa gefärbt, der für eine zweite Aufreinigung zugegebene frische „Solid support“ war dagegen nach Zentrifugation grün (Abb. 3.1.24 B). Auch hier wurde daher angenommen, dass die Proben optimal aufgereinigt waren und sich kaum noch freier Farbstoff in der Probe befand.

Die jeweils maximal aufgereinigten LHCII-Trimere wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert. Wie erwartet zeigte sich in den markierten Proben auf Höhe des Coomassie-Proteinsignals auch ein Fluoreszenzsignal, welches in der unmarkierten Kontrolle nicht auftrat. Die Analyse der Fluoreszenz in der Lauffront ergab jedoch bei den markierten Proben ein deutlich stärkeres Signal als in der Kontrolle. Durch die

denaturierenden Eigenschaften der SDS-PAGE werden die nicht kovalent gebundenen Chlorophylle und Carotinoide von den Proteinen getrennt. Sie befinden sich auf Grund ihrer geringen Größe auf Höhe der Laufront und verursachen dort ein Fluoreszenzsignal. Dieses sollte in markierten und unmarkierten Proben gleich intensiv sein. Die zusätzliche Fluoreszenz in den markierten Proben konnte nur durch aminoreaktive Farbstoffmoleküle hervorgerufen werden, welche nicht kovalent an den LHCII gebunden waren und sich deswegen auch in der Laufront befanden.

Es war also davon auszugehen, dass sich trotz vermeintlich optimaler Aufreinigung noch überschüssiger Farbstoff in den Proben befand. Dieser wäre dann auch für die geringe Löschung der Donorfluoreszenz verantwortlich. Daher wurde im Folgenden die Aufreinigung der Komplexe weiter optimiert.

1.2.2.4 Optimierung der Probenaufreinigung

Da die Aufreinigung durch Gelfiltration bzw. mit „Solid support“ nicht den gewünschten Erfolg brachte, wurde nach einer weiteren Möglichkeit gesucht, die überschüssigen Farbstoffe aus den Proben zu entfernen. Die Experimente zur Optimierung wurden auf Grund des besseren Verhältnisses der Extinktionskoeffizienten nur mit Rho-NHS durchgeführt.

Der erste Versuch beinhaltete die Fällung und damit komplette Zerstörung der gefalteten Trimere nach aminoreaktiver Markierung. Das gefällte Protein kann mehrmals gewaschen werden, wodurch freie Farbstoffmoleküle entfernt werden. Diese Aufreinigungsmethode wird bei der cysteinreaktiven Markierung standardmäßig benutzt. Es wurden 350 µg C3.2h-Trimere mit Rho-NHS markiert. Nach der anschließenden Fällung konnten nur noch 80 µg wieder gewonnen werden, welche rekonstituiert und trimerisiert wurden. Nach der Ultrazentrifugation erkannte man zwar Banden auf Höhe der erwarteten Komplexe, diese waren jedoch sehr gering konzentriert, weshalb auf eine weitere Charakterisierung der Proben verzichtet wurde. Der Proteinverlust durch Faltung, Fällung und erneute Faltung war anscheinend sehr groß (Abb. 3.1.25 A). Für eine akzeptable Trimerausbeute nach der zweiten Ultrazentrifugation hätte ein Vielfaches der Proteinmenge eingesetzt werden müssen.

Um den hohen Materialeinsatz zu umgehen, markierte man als nächstes nicht aufgereinigte Trimere nach der Ni-Säule im Eluat. Die darauffolgende Ultrazentrifugation erfüllte in dieser Methode sowohl die Trennung von gefalteten und ungefalteten Komplexen, als auch die Abtrennung des freien Farbstoffs. Die hierbei erreichten Trimerausbeuten waren denen einer unmarkierten Kontrolle vergleichbar (Abb. 3.1.25 B). Die Analyse der Absorptionsspektren ergab jedoch nur eine minimale Menge von 0,5 Rho-NHS-Molekülen je LHCII-Monomer (ohne Abbildung).

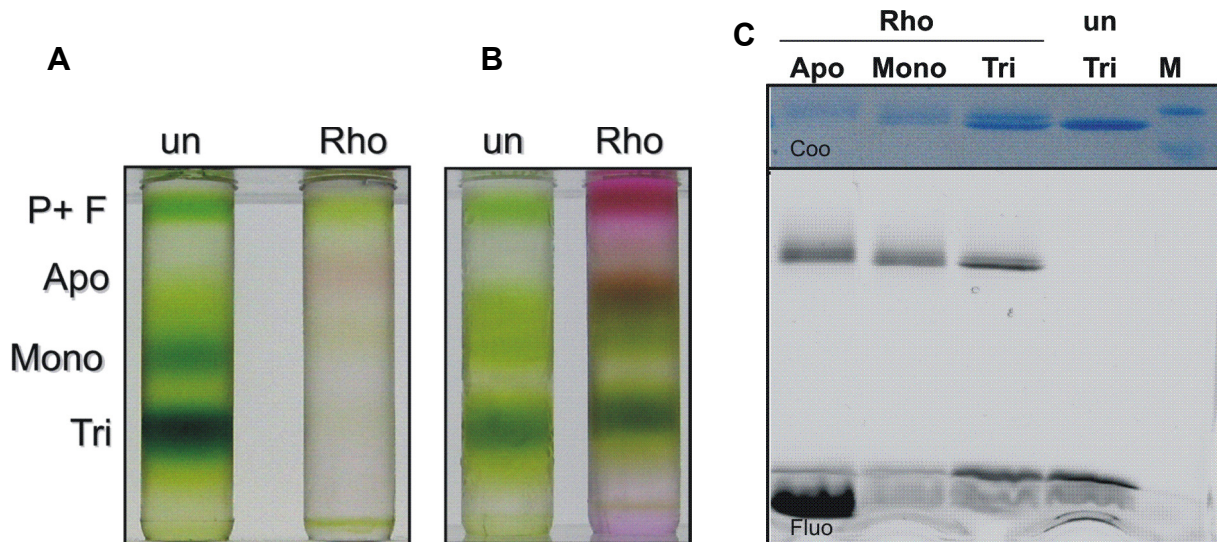


Abb. 3.1.25 Aufreinigung von aminoreaktiv markiertem C3.2h durch Ultrazentrifugation.

A) Rho-C3.2h Trimere wurden gefällt, das gefällte Protein erneut rekonstituiert, trimerisiert und durch Ultrazentrifugation aufgereinigt, B) Markierung mit Rho-NHS am Ni-Säuleneluat und anschließender Ultrazentrifugation, C) SDS-PAGE von der Apoprotein- (Apo), Monomer- (Mono) und Trimerbande (Tri) aus (B), Analyse durch Coomassiefärbung (Coo) und Fluoreszenzsignal (Fluo), un – unmarkierte C3.2h, Rho – Rho-C3.2h, P+F – freies Pigment und freier Farbstoff, M – Marker.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die markierten Trimere, Monomere und das ungefaltete Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt. In allen Proben konnte durch das Coomassiesignal Protein nachgewiesen werden, die markierten Proben fluoreszierten auf Proteinhöhe (Abb. 3.1.25 C). Obwohl die Probe des ungefalteten Proteins ein sehr schwaches Coomassiesignal aufwies, fluoreszierte es stark. Es war anscheinend sehr effizient markiert worden. Andererseits wiesen die markierten Trimere in der Lauffront keine stärkere Fluoreszenz auf als die unmarkierte Probe. Daher wurde angenommen, dass durch die Aufreinigung mit Ultrazentrifugation prinzipiell das Ziel der kompletten Entfernung des freien Farbstoffes erreicht wurde. Um die Anwesenheit von ungefalteten LHCII in dem Markierungsansatz zu umgehen, welche sehr effizient markiert werden können, wurden im Folgenden aufgereinigte Trimere markiert, welche anschließend durch Ultrazentrifugation vom freien Farbstoff getrennt wurden.

Diese Vorgehensweise wurde zur optimalen Markierung mit einem 100fach molaren Überschuss an Rho-NHS durchgeführt. Nach der aufreinigenden Ultrazentrifugation befanden sich in der unmarkierten Kontrolle hauptsächlich Trimere im Gradienten. Diese waren bei der Rho-markierten Probe ungefähr gleich konzentriert, wiesen aber einen bräunlichen Grünton auf. Zusätzlich war auf Höhe des freien Pigments der freie Farbstoff durch eine intensive Rosafärbung zu erkennen (Abb. 3.1.26 A). Um die Abwesenheit von überschüssigem Rho-NHS in den Trimeren zu bestätigen, wurden sie durch SDS-PAGE aufgetrennt. Hier konnte durch ein Fluoreszenzsignal auf Höhe der Coomassiebande die kovalente Bindung nachgewiesen werden. In der Lauffront zeigte sich im Vergleich zur unmarkierten Probe aber keine intensivere Fluoreszenz (Abb. 3.1.26 B).

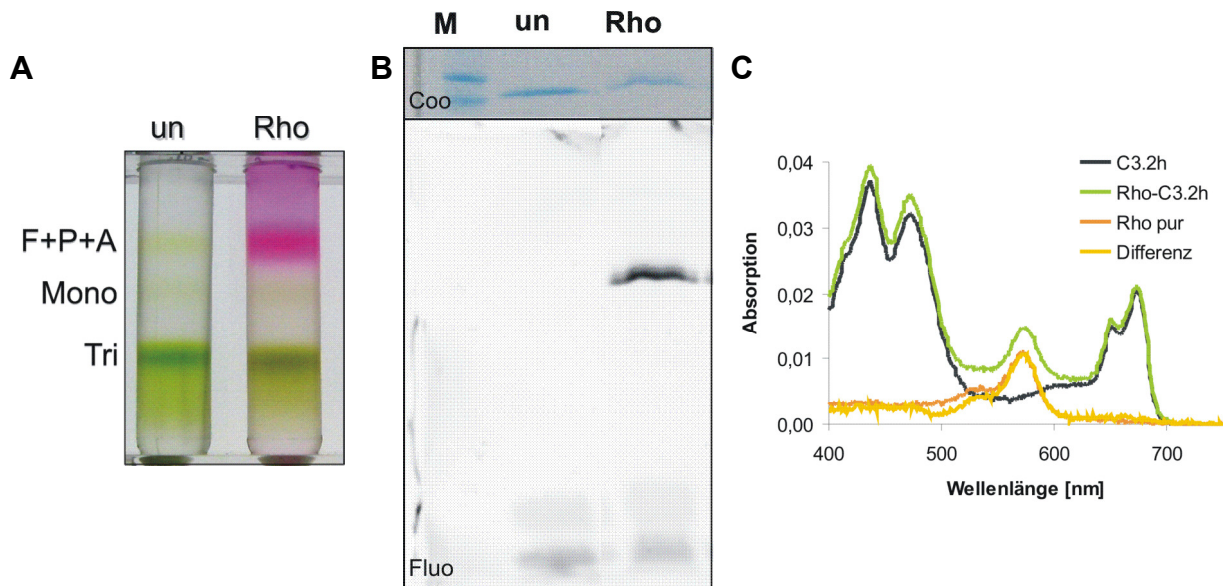


Abb. 3.1.26 Optimierte Markierung und Aufreinigung von Rho-C3.2h.

A) C3.2h-Trimere wurden mit Rho-NHS markiert und durch erneute Ultrazentrifugation aufgereinigt. F+P+A – freier Farbstoff, Pigment, Apoprotein, Mono – Monomere, Tri – Trimere, B) SDS-PAGE der in (A) aufgereinigten LHCII-Trimere, M – Marker, un – unmarkierter C3.2h, Rho – Rho-C3.2h, C) Absorptionsspektren der in (A) aufgereinigten Komplexe, Konzentration der LHCII-Proben jeweils 37 nM, als Kontrolle dient freies Rho-NHS in derselben Konzentration wie in Rho-C3.2h (Rho pur), außerdem ist das Differenzspektrum von markiertem und unmarkiertem C3.2h gezeigt (Differenz).

Die Berechnung der kovalent an die C3.2h-Trimere gebundenen Farbstoffmoleküle anhand der Absorptionsspektren wurde nun, aufgrund der Abwesenheit von freiem Farbstoff, unter Annahme, dass sich der Extinktionskoeffizient des Farbstoffs nicht durch die Bindung ändert, möglich. Demnach waren 2,36 Rho-NHS-Moleküle je LHCII-Monomer gebunden. Die interessante Frage war nun, wie stark in dieser Probe die Donorfluoreszenz gelöscht wird. Dafür wurden, wie in allen vorherigen Messungen zum Energietransfer auch, unmarkierte C3.2h-Trimere und Rho-C3.2h auf dieselbe Konzentration gebracht. Diese wurde anhand von Absorptionsspektren kontrolliert (Abb. 3.1.26 C). Mit den so vorbereiteten Proben wurden nun Fluoreszenzmessungen durchgeführt.

Die Anregung bei 470 nm führte sowohl bei der unmarkierten als auch bei der markierten Probe zu einem einzigen Fluoreszenzsignal, dessen Maximum bei 680 nm lag (Abb. 3.1.27 A). Der Energietransfer innerhalb der Komplexe war demnach nicht gestört. Allerdings war die Intensität bei Rho-C3.2h deutlich geringer. Ein Vergleich der Flächen ergab nur 57% der Fluoreszenz von unmarkierten Trimeren. Während unmarkierter C3.2h auch nach Anregung mit 550 nm ein einziges Fluoreszenzmaximum bei 680 nm aufwies, wurde bei Rho-C3.2h noch ein zweites bei 588 nm sichtbar, welches von Rho-NHS stammte (Abb. 3.1.27 B). Das Verhältnis von Farbstoff- zu LHCII-Fluoreszenz war in dieser Probe im Vergleich zu den vorherigen Analysen allerdings deutlich zu Gunsten des LHCII verschoben (vgl. Abb. 3.1.23 B). Die Gegenüberstellung mit der Fluoreszenz des freien Farbstoffs der gleichen Konzentration ergab eine zu 87% gelöschte Donorfluoreszenz.

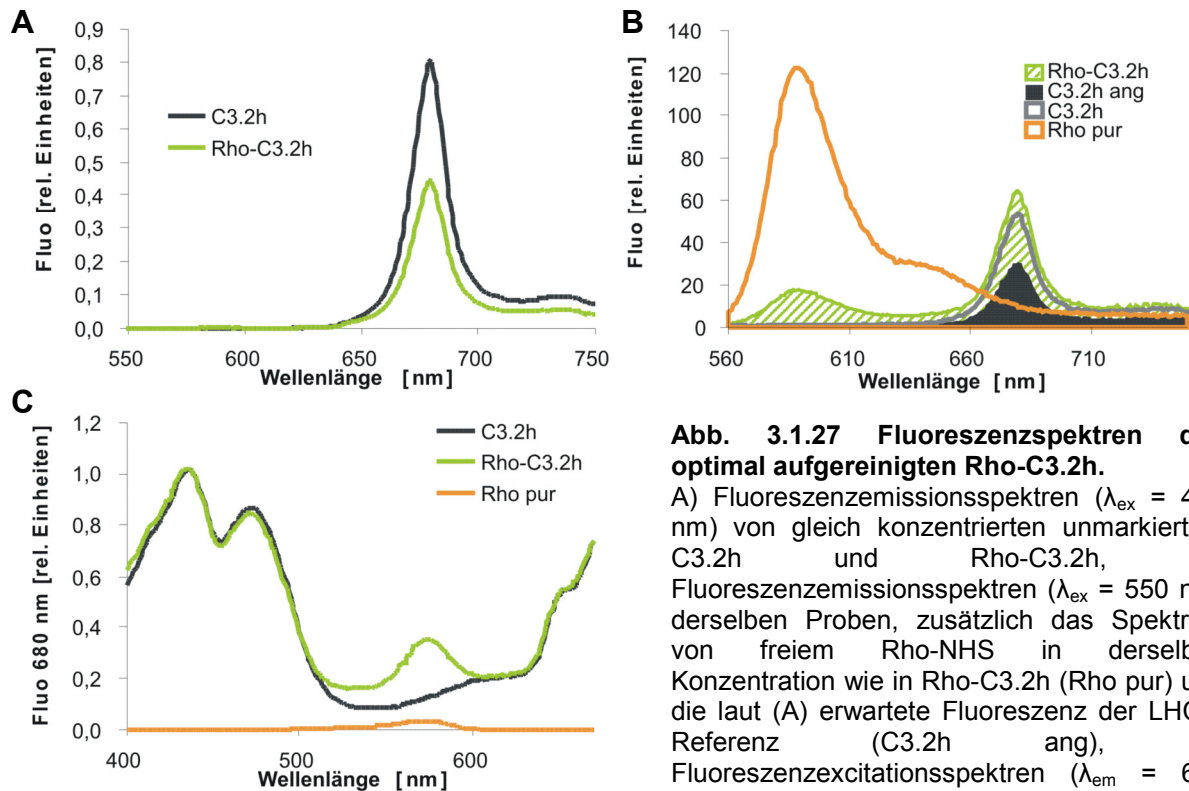


Abb. 3.1.27 Fluoreszenzspektren des optimal aufgereinigten Rho-C3.2h.

A) Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) von gleich konzentrierten unmarkiertem C3.2h und Rho-C3.2h, B) Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 550$ nm) derselben Proben, zusätzlich das Spektrum von freiem Rho-NHS in derselben Konzentration wie in Rho-C3.2h (Rho pur) und die laut (A) erwartete Fluoreszenz der LHCII-Referenz (C3.2h ang), C) Fluoreszenzexcitationsspektren ($\lambda_{\text{em}} = 680$ nm) derselben Proben, Spektren wurden bei

670 nm normiert.

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Fragen des Energietransfers ist das Ausmaß der sensibilisierten Akzeptorfluoreszenz. Die Fluoreszenz des LHCII-Anteils bei Rho-C3.2h war dabei deutlich größer als die der unmarkierten Kontrolle. Die Fluoreszenzquantenausbeute von Rho-NHS wurde mit 0,6 bestimmt, weshalb bei einer Quantenausbeute des LHCII von 0,2 ein Flächenverhältnis von Akzeptorzuwachs zu Donorlöschung von 0,33 erwartet wurde. Das tatsächlich gemessene Verhältnis betrug 0,05 (Berechnung mit Wellenzahl statt Wellenlänge). Unter der Annahme, dass die LHCII-Quantenausbeute durch die Markierung mit Rho-NHS, wie bei einer Anregung von 470 nm zu sehen, um 57% niedriger und damit bei 0,115 liegt, wäre das erwartete Verhältnis 0,19, das tatsächlich gemessene (auch auf Grundlage der angepassten LHCII-Referenz) 0,15.

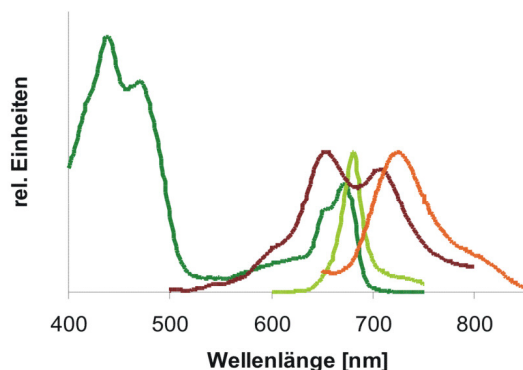
Der effiziente Energietransfer wurde auch durch Fluoreszenzexcitationsspektren ($\lambda_{\text{em}} = 680$ nm) belegt. Hier war zwischen 500 und 600 nm ein deutlicher Beitrag der Rho-Absorption an der LHCII-Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 3.1.27 C). Demnach konnte auch durch die Verwendung von aminoreaktiven Farbstoffen die Grünlücke der LHCII-Absorption gefüllt werden.

2 Versuche mit Rylen-Akzeptorfarbstoffen

Zusätzlich zu Farbstoffen, die in der Grünlücke des LHCII absorbieren, und somit als Energiedonoren für den LHCII fungieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Farbstoffe verwendet, die als Energieakzeptoren für den LHCII in Frage kommen. Diese Farbstoffe könnten zum Beispiel einen Endakzeptor für Hybridkomplexe aus Typ I QDs und LHCII darstellen. Insgesamt wurden zwei Terrylen- und ein Quatterrylenfarbstoff bezüglich ihrer Markierung von LHCII und ihrer weiteren Verwendbarkeit in Hybridkomplexen getestet. Alle drei Farbstoffe besaßen eine Maleimid-Gruppe. Die Versuche wurden daher mit der Einzel-Cystein Mutante S3Ch durchgeführt.

2.1 Markierung mit DNQDI

Das Absorptionsspektrum des Quatterrylen-Farbstoffs DNQDI (Dinaphtho-quatterrylendiimid) besitzt zwei Maxima bei 653 und 707 nm. Diese zeichnen ihn als potentiellen Akzeptorfarbstoff für den LHCII aus (Abb. 3.2.1). DNQDI ist sehr hydrophob, es löst sich nicht in Ethanol oder DMSO, nur in DMF oder Aceton. Für die Markierung mit S3Ch musste daher das Protokoll geringfügig verändert werden. Standardmäßig wird das gefällte



markierte Protein durch mehrere Waschschrte mit 70% Ethanol von freiem Farbstoff getrennt. Auf Grund der geringen Löslichkeit von DNQDI wurde bei diesen Versuchen stattdessen eiskaltes Aceton verwendet.

Abb. 3.2.1 Der Fluoreszenzfarbstoff DNQDI.

Normierte Absorptions- und Fluoreszenzspektren von DNQDI (rot und orange) und LHCII (dunkelgrün und hellgrün).

Für die Optimierung der Markierung wurden verschiedene Farbstoffmengen in der Reaktion eingesetzt. Außerdem wurden die DNQDI-markierten Proben anschließend mit Bodipy-IAA nachmarkiert und photometrisch ausgewertet. Bei steigender Menge an eingesetztem DNQDI verringerte sich die Ausbeute der Bodipy-IAA- bzw. erhöhte sich die Ausbeute der DNQDI-Markierung (Abb. 3.2.2). Diese Veränderung war allerdings zwischen einem 10 und einem 20fach molaren Überschuss sehr viel deutlicher als zwischen einem 20 und 30fachen. Es wurde daher davon ausgegangen, dass schon bei einem 20fach molaren DNQDI-Überschuss eine maximale Markierung stattfindet, während die weitere Zugabe von DNQDI dieses Ergebnis nicht signifikant verbessern konnte. Auffallend war dabei jedoch, dass die Summe aus Bodipy-IAA- und DNQDI-Markierung nie einen Wert von 100% und

damit eine vollständige Belegung aller SH-Gruppen mit Farbstoffen ergab. Bei einem 10fachen molaren DNQDI-Überschuss betrug die rechnerische Belegung 55%, bei einem 20fachen 45% und bei einem 30fachen 44%.

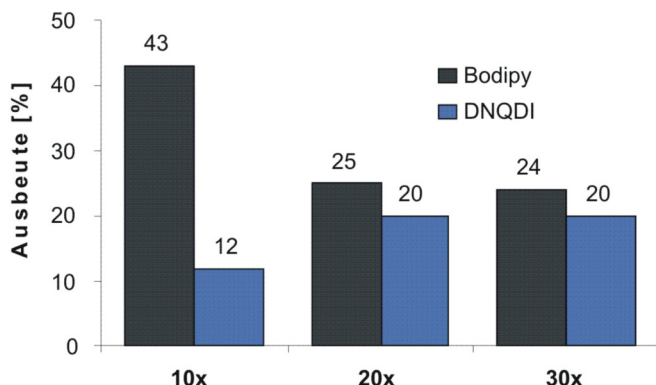


Abb. 3.2.2 Ausbeuten der Markierung von S3Ch mit DNQDI.

Nach der Markierung von S3Ch-Apoprotein mit 10, 20 und 30fach (10x, 20x, 30x) molarem Überschuss an DNQDI wurden alle Proben mit 50fach molarem Überschuss an Bodipy-IAA nachmarkiert. Die Auswertung erfolgte durch Absorptionsmessungen.

Trotz dieser Diskrepanz wurden DNQDI-markierte S3Ch-Proben rekonstituiert, um zum Einen die mögliche Auswirkung von DNQDI auf die Proteinfaltung und zum Anderen den Energietransfer zwischen LHCII und Farbstoff zu untersuchen. Die erhaltenen Monomere zeigten die gleichen CD-Signale und Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) wie die unmarkierte Kontrolle, weshalb von einer korrekten Proteinfaltung ausgegangen wurde (keine Abbildung). Allerdings konnte weder in den Fluoreszenzspektren noch in den Absorptionsspektren ein Beitrag des DNQDI gesehen werden (Abb. 3.2.3 A). Die mögliche Erklärung dafür lieferte das Ergebnis einer SDS-PAGE mit Bodipy-IAA nachmarkiertem DNQDI-S3Ch im Vergleich zu DY731-S3Ch. Bei beiden Apoprotein-Proben zeigte sich in der Coomassie-Färbung ein Proteinsignal, welches auch in Fluoreszenzmessungen mit dem Filter 520LP detektiert werden konnte (Abb. 3.2.3 B). Bei der Verwendung des Filters 530DF70 verschwand dieses Signal allerdings bei DY731-S3Ch, während es bei nachmarkiertem DNQDI-S3Ch erhalten blieb. Dieser Filter lässt die langwellige Fluoreszenz von DY731 und DNQDI nicht durch, die noch sichtbare Fluoreszenz stammt daher von Bodipy-IAA. Interessant war nun ein Signal in der Tasche des doppelt markierten S3Ch. Dieses erschien nur bei der Verwendung von 520LP und ist somit DNQDI zuzuordnen. Bei der genaueren Betrachtung des Coomassie gefärbten Gels erkennt man in dieser Tasche auch ein Proteinsignal. Es erscheint daher denkbar, dass die Markierung von S3Ch mit DNQDI zwar durchaus erfolgreich ist, das Protein hinterher durch den Farbstoff allerdings nicht mehr mit SDS gelöst werden kann. Daher bleibt es zum Einen als Apoprotein in der Geltasche hängen, zum Anderen kann es nicht korrekt falten, wodurch kein Nachweis für DNQDI in der rekonstituierten Probe zu finden ist. Ein potentieller Akzeptorfarbstoff sollte daher hydrophilere Eigenschaften aufweisen als DNQDI.

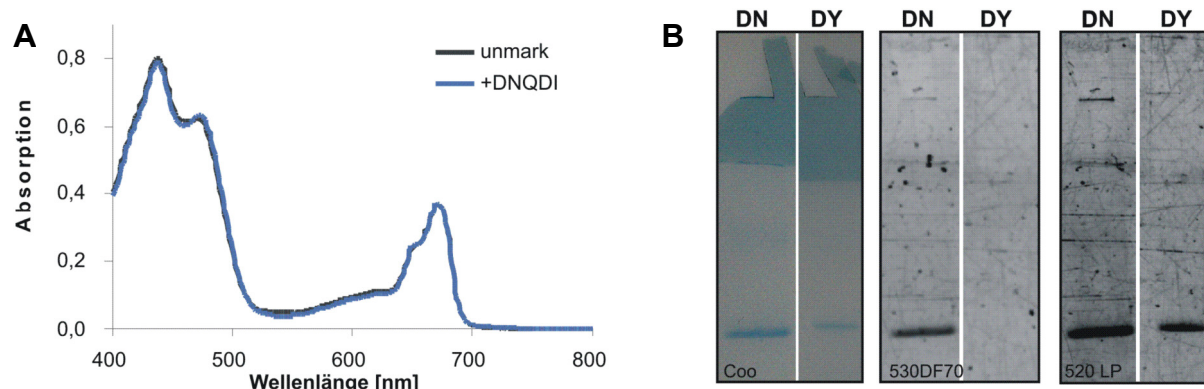


Abb. 3.2.3 Rekonstitution von DNQDI-S3Ch.

A) Absorptionsspektren von DNQDI- (+DNQDI) und unmarkierten (unmark) S3Ch-Monomeren, Spektren wurden bei 670 nm normiert. B) Coomassie- (Coo) und Fluoreszenzsignal (je nach verwendetem Filter 530DF70 oder 520LP) nach SDS-PAGE von markierten S3Ch-Apoproteinen. DN – S3Ch mit DNQDI und Bodipy markiert, DY – mit DY731 markiert.

2.2 Markierung mit TDI-Mal

Als weiterer potentieller Akzeptorfarbstoff wurde der Maleimid-funktionalisierte Terrylenfarbstoff TDI-Mal getestet. Er besitzt wie PDI-Mal vier Sulfonsäurereste und ist dadurch gut in Wasser löslich (Peneva et al., 2008a). Die Markierung von S3Ch mit TDI-Mal erfolgte nach dem Standardprotokoll und ergab nach Berechnung anhand der Absorptionsspektren Ausbeuten von annähernd 100% am Apoprotein. Als Kontrolle wurde in diesem Versuch S3Ch mit dem nicht funktionalisierten Farbstoff (TDI-nf) nach demselben Protokoll inkubiert. Hier ergab sich eine rechnerische Markierung von 36%. Nach der anschließenden SDS-PAGE konnte zwar bei beiden Proben eine Proteinbande auf derselben Höhe wie beim unmarkierten Protein detektiert werden, allerdings zeigte sich nur bei der Probe, die mit TDI-Mal markiert worden war, ein Fluoreszenzsignal (Abb. 3.2.4). Das durch Absorptionsspektren detektierte TDI-nf war demnach nicht kovalent an das Protein gebunden und es konnte von einer spezifischen, mindestens 74%igen Markierung mit TDI-Mal ausgegangen werden.

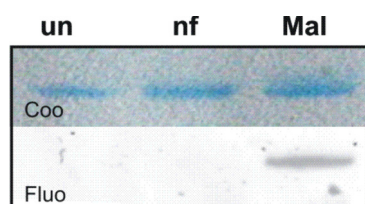


Abb. 3.2.4 Markierung mit TDI.

Coomassie- (Coo) und Fluoreszenzsignal (Fluo) nach SDS-PAGE von unmarkiertem (un) sowie markiertem S3C-Apoprotein. nf – Markierung mit TDI-nf, Mal – Markierung mit TDI-Mal.

Zur weiteren Charakterisierung von TDI-S3Ch wurde das markierte Protein nach dem Standardprotokoll rekonstituiert und mit unmarkierten S3Ch-Monomeren verglichen. Die Absorptionsspektren beider Proben waren dabei sehr ähnlich. Allerdings ergab sich bei TDI-S3Ch eine erhöhte Absorption in der Q_y-Region (Abb. 3.2.5 A). Das Differenzspektrum dieser beiden Proben zeigte einen Verlauf, der dem des freien Farbstoffs gleich. Allerdings war eine genaue Berechnung der Markierungsausbeute durch die gemeinsame Absorption von LHCII

und TDI-Mal bei 670 nm nicht möglich, eine grobe Schätzung ergab jedoch auch hier, ähnlich der Berechnung am Apoprotein, eine nahezu vollständige Markierung.

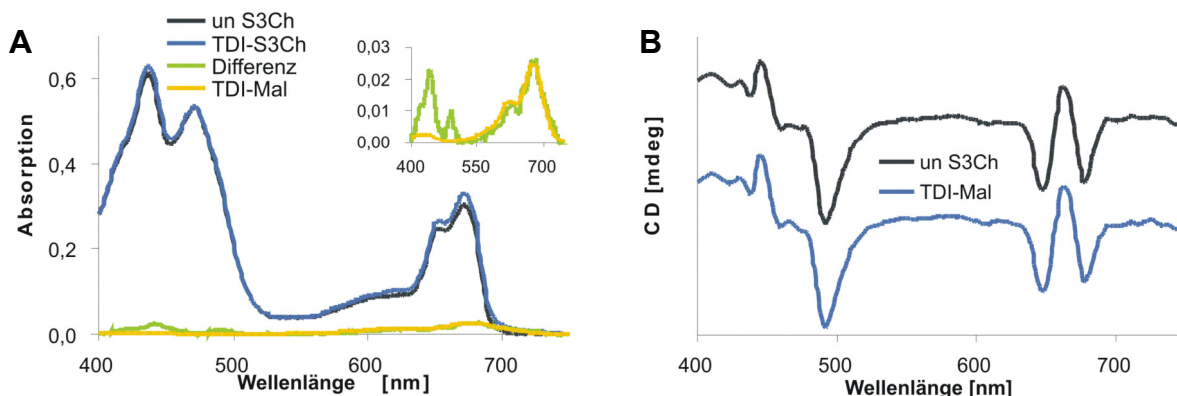


Abb. 3.2.5 Charakterisierung von TDI-S3Ch Monomeren.

A) Absorptionsspektren von TDI-Mal markiertem (TDI-S3Ch) und unmarkiertem (un S3Ch) S3Ch, außerdem ist die Differenz beider Spektren und das Spektrum von freiem TDI-Mal (TDI-Mal) dargestellt. B) CD-Spektren derselben Proben, für eine bessere Übersicht gestaffelt dargestellt.

Auch das CD-Spektrum von TDI-S3Ch zeigte im Vergleich zur unmarkierten Kontrolle keine Veränderung (Abb. 3.2.5 B). Die LHCII-Konzentration von TDI-S3Ch konnte wie oben erwähnt nicht genau bestimmt werden, jedoch bestätigte die gleiche Signalstärke in den CD-Spektren, dass die markierte Probe annähernd dieselbe Konzentration hatte, wie die unmarkierte Kontrolle.

Für die Nutzung von TDI-S3Ch in weiteren Hybridkomplexen, war nun die entscheidende Frage, ob ein Energietransfer von LHCII auf TDI-Mal beobachtet werden konnte. Hierfür wurden Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) von den nahezu gleich konzentrierten unmarkierten und TDI-S3Ch Monomeren gemessen. Beide Proben zeigten ein einziges Maximum bei 680 nm, wobei die Abwesenheit einer prominenten Schulter um 660 nm für einen intakten Energietransfer innerhalb des Komplexes sprach (Abb. 3.2.6).

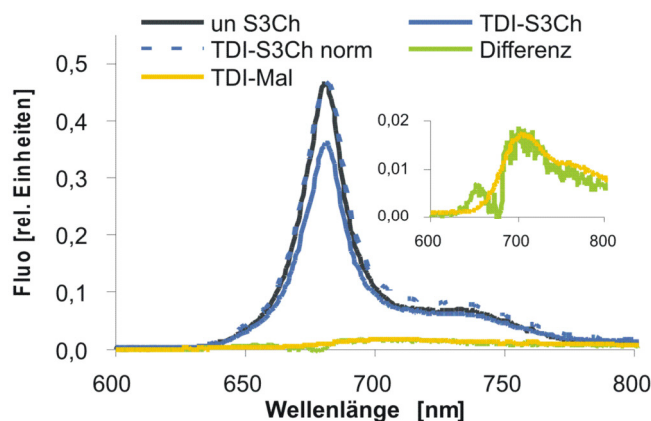


Abb. 3.2.6 Energietransfer bei TDI-S3Ch Monomeren.

Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) von unmarkiertem (un S3Ch) und TDI-Mal markiertem S3Ch (TDI-S3Ch), außerdem wurde das Spektrum von TDI-S3Ch bei 680 nm auf die unmarkierte Probe normiert (TDI-S3Ch norm) und die Differenz der normierten Spektren dargestellt (Differenz), als Vergleich dient das Spektrum des freien Farbstoffs (TDI-Mal).

Die Fluoreszenzintensität war bei TDI-S3Ch jedoch schwächer als bei der Kontrolle. Um die beiden Spektren besser miteinander vergleichen zu können, wurden sie daher auf 680 nm normiert. Dadurch wurde eine verstärkte Fluoreszenz bei der markierten Probe um 700 nm sichtbar. Die Differenz der normierten Spektren zeigte dabei denselben Verlauf wie die Fluoreszenzemission des freien Farbstoffs.

Die genaue Berechnung des Energietransfers ergab eine um 24% verringerte LHCII-Fluoreszenz (Donor). Die Quantenausbeute von TDI-Mal in 0,1% LM beträgt 5%. Daher wird für das Flächenverhältnis von sensibilisierter Akzeptorfluoreszenz zu gelöschter Donorfluoreszenz ein Wert von 0,25 erwartet. Der tatsächliche Wert bei einer Berechnung mit Wellenzahlen betrug 0,196. Somit ergibt sich zwar ein prozentual geringer Energietransfer von LHCII auf TDI-Mal, jedoch kann die gesamte Energie, die auf der Donorseite verschwindet, am Akzeptor wiedergefunden werden.

2.3 Versuche mit TMIMA

Die Markierung von S3Ch mit TDI-Mal führte zu einem Hybridkomplex, bei dem die Proteinstruktur nicht beeinflusst wurde, aber nur ein geringfügiger Energietransfer von LHCII auf TDI-Mal zu beobachten war. Dennoch erschien es sinnvoll vergleichbare Komplexe als Elektronendonoren in z.B. DSSCs zu verwenden. Durch die Anwesenheit eines Endakzeptors sollte dabei der Energietransfer in Richtung des Farbstoffs optimiert werden. Der Terrylenfarbstoff TMIMA schien für die Anwendung besser geeignet als TDI-Mal. Er kann durch ein Carbonsäureanhydrid optimal mit dem TiO_2 der potentiellen DSSCs interagieren (Edvinsson et al., 2009). Durch die Maleimidgruppe ist außerdem wie bei TDI-Mal eine kovalente Bindung an S3Ch möglich. Allerdings ist TMIMA nicht wasserlöslich sondern ähnlich hydrophob wie DNQDI (vgl. III.2.1).

2.3.1 Markierung von S3Ch mit TMIMA

Auch bei der Verwendung von TMIMA wurde die Markierungsreaktion optimiert. Die Markierungsausbeuten wurden dafür über Absorptionsspektren berechnet. Bei der Verwendung eines 15fach molaren Überschusses von TMIMA und unter ansonsten standardmäßigen Bedingungen, abgesehen von der Verwendung von Aceton in den Waschschritten analog zu der Markierung mit DNQDI, betrug diese 5% (Abb. 3.2.7 A). Um eine bessere Markierungsausbeute zu erhalten wurde zum Einen mehr Farbstoff in die Reaktion eingesetzt, zum Anderen ließ man den Ansatz für mehrere Stunden im Ultraschallbad inkubieren.

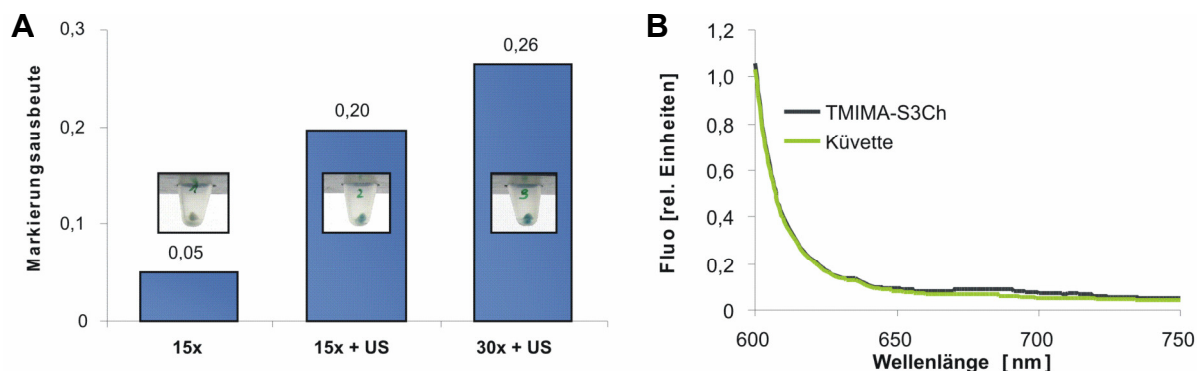


Abb. 3.2.7 Markierung von S3Ch mit TMIMA.

A) Markierungsausbeuten bei unterschiedlichen Bedingungen, die Auswertung erfolgte durch Absorptionmessungen, 15x/30x – Verwendung eines 15fach bzw. 30fach molaren Überschusses an Farbstoff, US – Inkubation im Ultraschallbad, außerdem dargestellt die Färbung der gefällten Proteinproben. B) Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 580 \text{ nm}$) von TMIMA markiertem S3Ch bzw. der leeren Küvette.

Der Gedanke dabei war, dass sich im Ultraschallbad der Farbstoff und das Protein durch eine ständige Durchmischung häufiger treffen und somit auch die Wahrscheinlichkeit der Reaktion gesteigert wird. Tatsächlich erhöhten beide Ansätze die Markierungsausbeute. Die Verwendung des Ultraschalls steigerte dabei die Ausbeute bei ansonsten gleichen Bedingungen deutlicher (20% zu 5%) als ein größerer Farbstoffüberschuss (26% zu 20%). Fluoreszenzemissionsspektren des ungefalteten TMIMA-S3Ch zeigten nur im Vergleich zu dem Spektrum einer leeren Küvette ein Signal (Abb. 3.2.7 B). Diese geringe Fluoreszenzquantenausbeute machte einen Nachweis der Markierung durch SDS-PAGE unmöglich. Die kovalente Bindung zwischen Farbstoff und Protein musste daher als gegeben angenommen werden.

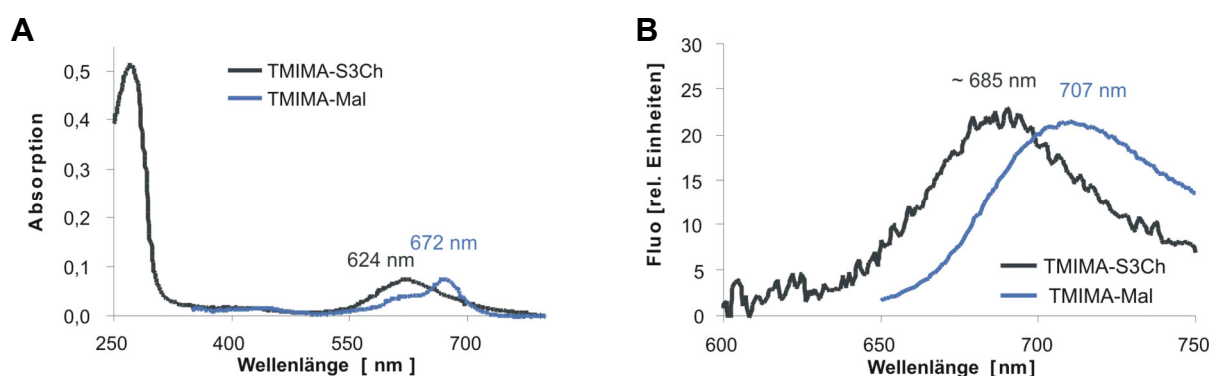


Abb. 3.2.8 Absorption und Fluoreszenz von TMIMA.

A) Absorptions- und B) Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 580 \text{ nm}$) von freiem TMIMA (TMIMA-Mal) und kovalent an S3Ch gebundenem TMIMA (S3Ch-TMIMA), dabei entspricht das Fluoreszenzspektrum von TMIMA-S3Ch dem Differenzspektrum aus Abb. 3.2.7 B, außerdem sind die Wellenlängen der jeweiligen Maxima angegeben.

Der Vergleich der spektralen Eigenschaften des freien und des kovalent an S3Ch gebundenen Farbstoffs ergab deutliche Unterschiede (Abb. 3.2.8). In beiden Fällen war das Maximum des gebundenen Farbstoffs in kürzerwellige Bereiche verschoben. Diese Veränderung betrug in der Absorption 48 nm, in der Fluoreszenz rund 22 nm. Das Absorptionsspektrum zeigte zusätzlich einen veränderten Verlauf. Freies TMIMA besitzt neben dem Maximum bei 672 nm noch eine ausgeprägte Schulter um 600 nm. Nach der Bindung an S3Ch ist dagegen nur ein einfaches Maximum ausgeprägt.

2.3.2 Rekonstitution und Energietransfer von TMIMA-S3Ch

Für die Verwendung von TMIMA-S3Ch in DSSCs, ist es wichtig, dass der LHCII trotz der Markierung korrekt faltet. Daher wurde TMIMA-S3Ch im Vergleich zu unmarkierten S3Ch-Monomeren auf ihre spektroskopischen Eigenschaften untersucht. Die Absorptionsspektren zeigten geringfügige Veränderung sowohl im Soret-Bereich als auch in der Q_y-Region (Abb. 3.2.9 A). Das Differenzspektrum glich aber nicht dem des Farbstoffs. Trotzdem wurde von einer annähernd gleichen Pigmentbindung ausgegangen. Dies wurde auch durch die CD-Spektren bestätigt. Hier konnten keine Veränderung auf Grund der Markierung des LHCII beobachtet werden (Abb. 3.2.9 B). Weiterhin war der Energietransfer innerhalb des LHCII von Chl *b* zu Chl *a* nicht gestört. Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) zeigten zwar eine geringfügige Schulter um 660 nm, diese war aber kaum deutlicher als bei der unmarkierten Kontrolle (Abb. 3.2.9 C).

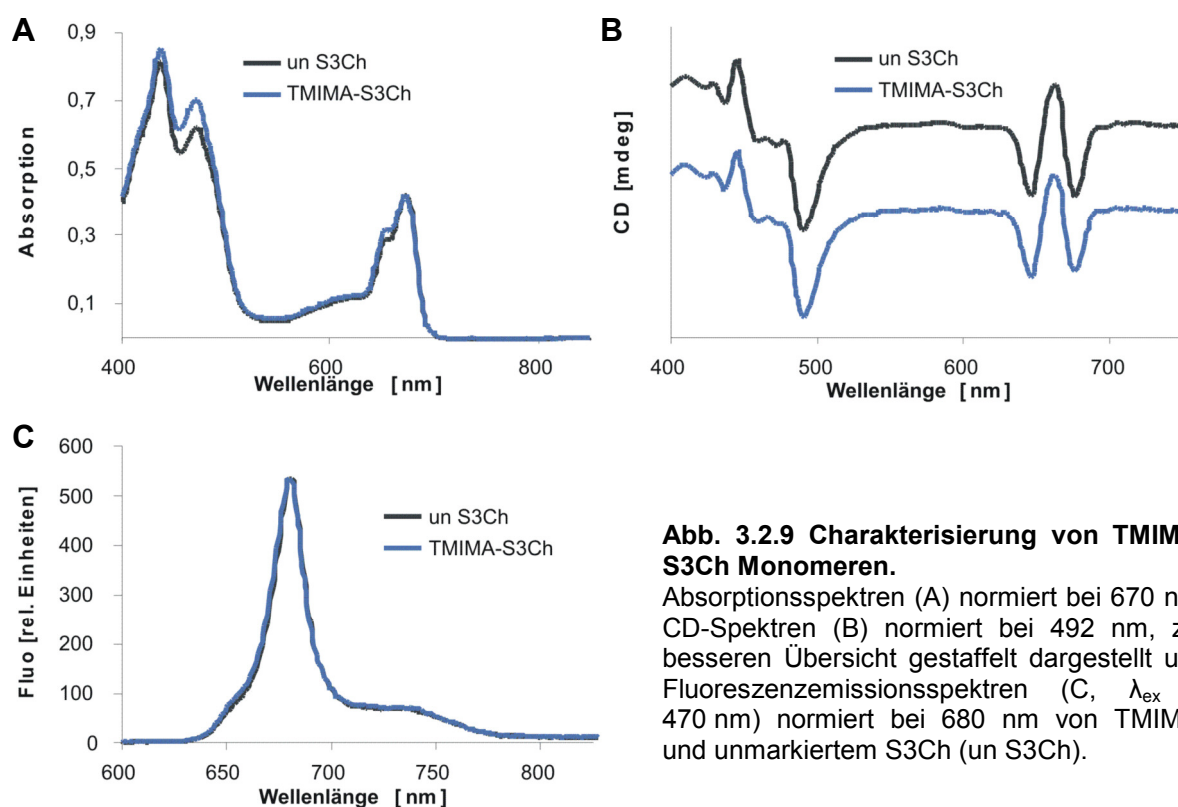


Abb. 3.2.9 Charakterisierung von TMIMA-S3Ch Monomeren.

Absorptionsspektren (A) normiert bei 670 nm, CD-Spektren (B) normiert bei 492 nm, zur besseren Übersicht gestaffelt dargestellt und Fluoreszenzemissionsspektren (C, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) normiert bei 680 nm von TMIMA- und unmarkiertem S3Ch (un S3Ch).

Die Anwesenheit von markierten Komplexen innerhalb der rekonstituierten Probe konnte jedoch durch keine der Messungen bewiesen werden. Allerdings schien es nicht verwunderlich, dass kein deutlicher TMIMA-Beitrag in den Absorptions- und Fluoreszenzspektren zu erkennen war. Zum einen war die Markierungsausbeute sehr gering, zum anderen ließ die geringe Quantenausbeute des an Protein gebundenen TMIMA kein deutliches Signal erwarten.

Um dennoch einen Nachweis von TMIMA in den rekonstituierten Proben zu finden, wurden zusätzlich verschiedene Fluoreszenzexcitationsspektren aufgenommen. Die Emissionswellenlänge betrug dabei entweder 680 nm oder 730 nm. Wenn bei 680 nm das Fluoreszenzsignal von Farbstoff und LHCII annähernd gleich wäre, würde es bei 730 nm durch den unterschiedlichen Verlauf der Emissionsspektren unterschiedlich intensiv sein (Abb. 3.2.10 A). Hier fluoresziert TMIMA deutlich stärker als LHCII. Daher schien es möglich durch den Vergleich der Gesamtfluoreszenzen der Excitationsspektren beider Wellenlängen eine Aussage über die Anwesenheit von TMIMA in den markierten Monomeren machen zu können. Tatsächlich ergab sich hierbei für den unmarkierten S3Ch ein niedrigerer Wert als bei TMIMA-S3Ch (Abb. 3.2.10 B). Es wurde daher angenommen, dass sich tatsächlich markierter LHCII in der Probe befand. Die Tatsache, dass dieser Effekt überhaupt zu sehen war – und prozentual nicht gering ausfiel (9%) – ließ sogar den Schluss zu, dass Energie von LHCII auf TMIMA übertragen werden konnte.

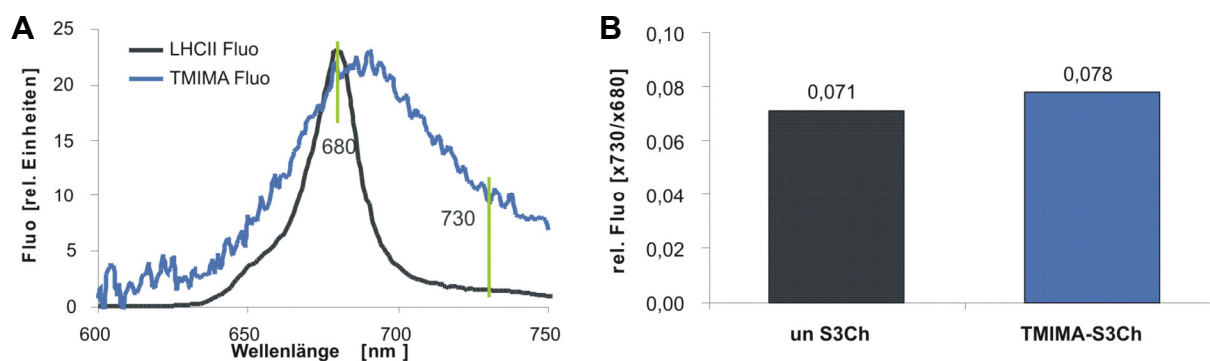


Abb. 3.2.10 Energietransfer bei TMIMA-S3Ch Monomeren.

A) Normierte Fluoreszenzemissionsspektren von LHCII und an Protein gebundenem TMIMA, grün dargestellt sind Emissionswellenlängen der durchgeführten Excitationsmessungen. B) Die Gesamtfluoreszenzen von Excitationsmessungen nach Anregung bei $\lambda_{em} = 680$ bzw. $\lambda_{em} = 730$ nm bei unmarkiertem S3Ch (un S3Ch) und TMIMA-S3Ch wurden ins Verhältnis gesetzt und die erhaltenen Werte graphisch dargestellt.

2.3.3 Adsorption von LHCII an TiO₂ mit und ohne TMIMA

Die Adsorption von LHCII an TiO₂ erfolgte im Rahmen dieser Arbeit anhand von zwei möglichen Strategien. Zum einen wurde der LHCII vor der Rekonstitution mit TMIMA markiert (vgl. III2.3.1 und III2.3.2). Die anschließend gefalteten Komplexe sollten aufgrund der Interaktion von TMIMA mit TiO₂ an die Oberfläche binden. Zum anderen wurde das TiO₂ zu erst mit TMIMA belegt, bei der anschließenden Inkubation mit LHCII sollten der Farbstoff und das Protein wie bei der Markierung des Apoproteins eine kovalente Bindung ausbilden. Als Kontrolle wurde unmarkierter LHCII mit TiO₂-Platten ohne Farbstoff inkubiert. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten TiO₂-Platten wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus Müllen am MPI für Polymerforschung hergestellt. Im Folgenden wird nur auf die Adsorption von LHCII an diese Platten eingegangen.

Vor und nach der Inkubation mit LHCII wurden von den Platten Absorptions- und Fluoreszenzspektren aufgenommen. Obwohl die Messungen immer eine starke Streuung aufwiesen, konnte dennoch ein eindeutiges Absorptionssignal des auf den Platten gebundenen TMIMA gemessen werden. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffs lag hier bei ungefähr 615 nm. Nach der Inkubation mit LHCII konnte dagegen kein zusätzliches Signal in den Absorptionsspektren beobachtet werden (Abb. 3.2.11 A+B). Dies galt sowohl für unmarkierte, als auch TMIMA-markierte Komplexe, unabhängig von der Verwendung von Monomeren und Trimeren sowie der Inkubationsdauer.

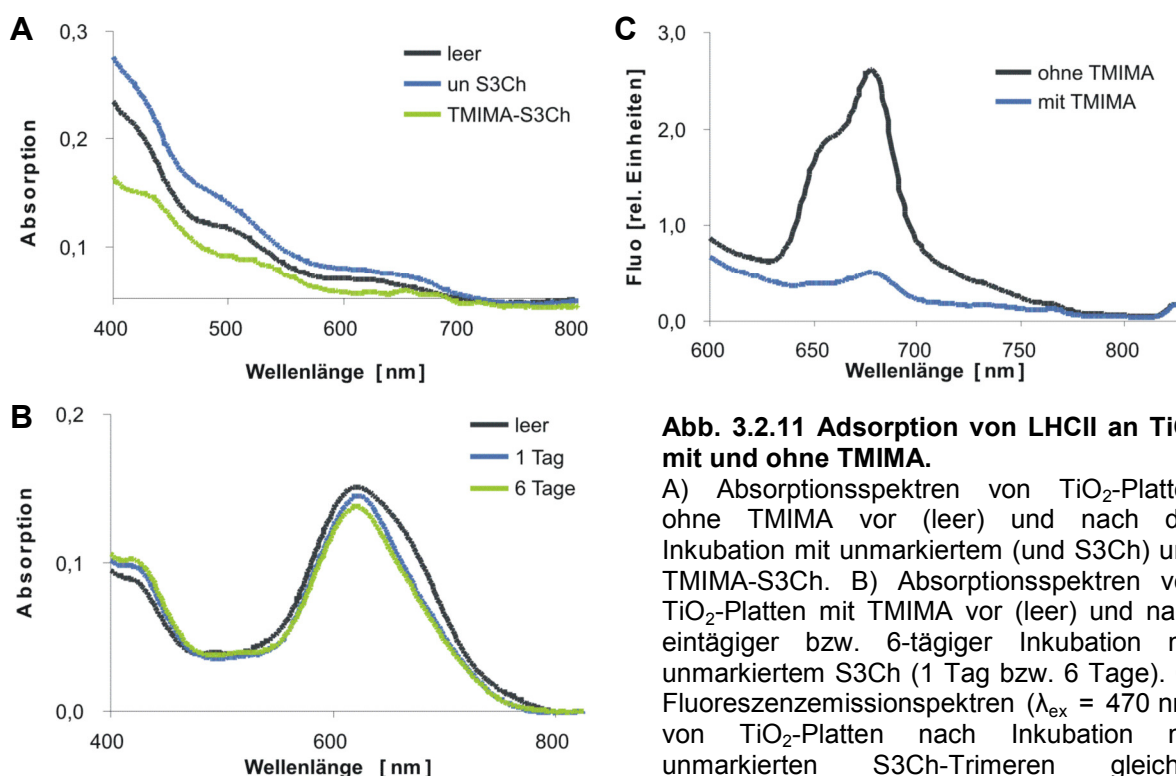


Abb. 3.2.11 Adsorption von LHCII an TiO₂ mit und ohne TMIMA.

A) Absorptionsspektren von TiO₂-Platten ohne TMIMA vor (leer) und nach der Inkubation mit unmarkiertem (und S3Ch) und TMIMA-S3Ch. B) Absorptionsspektren von TiO₂-Platten mit TMIMA vor (leer) und nach eintägiger bzw. 6-tägiger Inkubation mit unmarkiertem S3Ch (1 Tag bzw. 6 Tage). C) Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) von TiO₂-Platten nach Inkubation mit unmarkierten S3Ch-Trimeren gleicher Belegungsdichte, ohne TMIMA – Platten

ohne Farbstoff, mit TMIMA – Platten mit Farbstoff und Coadsorbant.

Die Berechnung der LHCII-Belegungsdichte erfolgte daher auf indirektem Weg. Hierfür wurde der nach Inkubation ungebundene LHCII spektroskopisch untersucht. Die gemessenen Fluoreszenz- und Absorptionsspektren zeigten, dass diese Komplexe noch intakt waren. Anhand der Absorption bei 670 nm wurde die Menge des ungebundenen LHCII bestimmt und mit der eingesetzten Menge verglichen. Dabei ergab sich über alle Versuche eine gemittelte Belegungsdichte von $0,0486 \pm 0,0146$ nmol LHCII / cm². Der Unterschied zwischen den einzelnen Versuchstagen war dabei größer als zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen, weshalb nicht von einer spezifischen Belegung mit LHCII durch Interaktion mit TMIMA ausgegangen wurde.

Der Nachweis, dass tatsächlich LHCII auf den Platten gebunden war, konnte schließlich durch Fluoreszenzspektren der belegten TiO₂-Platten erbracht werden. Hier war deutlich eine Fluoreszenz bei 680 nm zu erkennen, allerdings wiesen alle Spektren auch eine Chl *b*-Schulter bei 660 nm auf (Abb. 3.2.11 C). Die LHCII-Fluoreszenz war trotz gleicher Belegungsdichten bei Platten ohne TMIMA ungefähr dreimal so stark wie bei Platten mit Farbstoff. Dies legt nahe, dass ein Energietransfer von LHCII zu TMIMA auf den Platten stattfindet. In keinem der Spektren konnte dagegen ein Fluoreszenzsignal von TMIMA nachgewiesen werden.

Es erfolgte somit keine spezifische Belegung von LHCII an die verwendeten TiO₂-Platten, der mögliche Energietransfer von LHCII auf TMIMA bietet jedoch eine Motivation die Verwendung von Terrylen-LHCII-Hybridkomplexen in DSSCs weiter zu untersuchen.

3 „Neue“ Farbstoff-Protein-Interaktionen

Neben den etablierten Markierungsmethoden mit Maleimid- und N-Hydroxisuccinimidester-Farbstoffen wurden auch die Markierungen mit zwei weiteren aktiven Gruppen untersucht. Zum einen sollte das Prinzip der „nativen chemischen Ligation“ angewendet werden. Bei dieser Reaktion bildet sich eine Peptidbindung aus, weshalb sie besonders bei der Synthese von Peptiden Anwendung findet (Dawson et al., 1994). Hier wurde sie nun auf die Markierung eines N-terminalen Cysteins mit einem Thioesterfarbstoff übertragen. Zum anderen wurde Nitrilotriessigsäure (NTA) als aktive Gruppe eines Fluoreszenzfarbstoff untersucht. Die Interaktion von NTA mit Histidylresten führt nicht zu einer kovalenten Bindung und findet häufig bei Affinitätschromatographien Anwendung. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das Prinzip für eine schnelle Detektion von „His-Tag“-Proteinen in PA-Gelen verwendet werden kann.

3.1 „Native chemische Ligation“: Markierung mit einem Thioesterfarbstoff

Die hohen Reaktionsausbeuten unter moderaten Bedingungen bei einer „nativen chemischen Ligation“ machen diese als alternative Markierungsmethode interessant. Die Voraussetzung ist allerdings ein Protein mit N-terminalem Cystein, weshalb eine entsprechende LHCII-Mutante hergestellt wurde. Dabei stellte die Abspaltung des führenden Methionins bei der Proteinexpression die entscheidende Hürde dar. Anschließend wurden die Reaktionsbedingungen für eine Markierung von LHCP und PDI-TE optimiert und die Faltung des markierten Proteins überprüft.

3.1.1 Herstellung eines LHCII mit N-terminalem Cystein

Bei der Proteinexpression ist Methionin als erste Aminosäure unerlässlich und dementsprechend wurde für die Herstellung eines LHCII mit N-terminalem Cystein die folgende Aminosäure (Arg1) durch Punktmutation gegen Cystein ausgetauscht. Die posttranslationale Entfernung des führenden Methionins war anschließend für eine erfolgreiche Reaktion mit PDI-TE entscheidend. Die Mutation erfolgte mit dem „QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) an dem Plasmid von C79Sh, wobei das zweite LHCII-Triplett von CGT zu TGT verändert wurde und der LHCII-Klon R1Ch entstand. Die anschließende Transformation in XL1-Blue Zellen erbrachte nach Ausstreichen des halben Transformationsansatzes rund 100 Kolonien, von denen zwei für eine Plasmidisolation ausgesucht wurden. Die post- oder co-translationale Methionin-Abspaltung ist je nach verwendetem Bakterienstamm verschieden (Hirel et al., 1989), weshalb im Folgenden die Proteinexpression in drei verschiedenen Stämmen untersucht wurde. Die Transformation in

JM101 Zellen war problemlos, bei den Bakterienstämmen BL21 (DE3) und BL21 (DE3) pLysS war das Wachstum zunächst allerdings sehr langsam und es wurden erst nach sechs Tagen Kolonien sichtbar. Die Transformation des mutierten Plasmides wurde in allen drei Bakterienstämmen durch DNA-Sequenzierung bestätigt, außerdem war das Wachstum der beiden BL21-Stämme im Folgenden nicht mehr signifikant geringer als bei JM101. Die anschließende Proteinexpression wurde mit allen drei Bakterienstämmen analog zu dem Protokoll für Proteine mit N-terminalem Cystein von Gentle et al. (2004) durchgeführt, bei JM101 wurde zusätzlich das Standardprotokoll verwendet. In allen Ansätzen erfolgte die Zelllyse durch die Verwendung der „French Press“ und die anschließende Isolierung der „Inclusion Bodies“ anhand der standardmäßigen Waschschriffe.

Die Auftrennung der so erhaltenen Proteine durch SDS-PAGE zeigte, dass die Veränderung des Überexpressionsprotokolls bei JM101-Zellen keine Auswirkung auf die Reinheit der IBs hatte (Abb. 3.3.1). Diese war außerdem vergleichbar mit standardmäßig hergestellten S3Ch-IBs. Die Gesamtproteinausbeute wurde durch das angepasste Protokoll jedoch ungefähr um die Hälfte reduziert. Die LHCP-Expression in den beiden BL21-Stämmen war allerdings noch geringer. Nach der Proteinaufreinigung befanden sich noch zahlreiche Bakterienproteine in den Proben, weshalb die genaue LHCP-Ausbeute nicht bestimmt werden konnte. Sie betrug aber bei BL21 (DE3)-Zellen höchstens 5% im Vergleich zu der Expression in JM101 nach dem veränderten Protokoll, während sie in BL21 (DE3) pLysS Zellen sogar noch darunter lag.

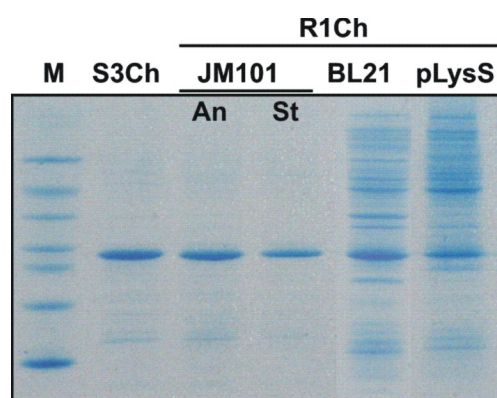


Abb. 3.3.1 Überexpression von R1Ch in verschiedenen Bakterienstämmen.

Die Überexpression erfolgte nach dem Standardrezept (S3Ch und JM101 St) bzw. nach dem Rezept für Proteine mit N-terminalem Cystein (JM101 An, BL21, pLysS). Es wurden von den erhaltenen Proben jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen und durch SDS-PAGE getrennt, die Färbung erfolgte mit Coomassie, M - Marker.

Für eine erfolgreiche Markierung nach dem Prinzip der „nativen chemischen Ligation“ war es zusätzlich notwendig zu wissen, ob in den erhaltenen LHCP-Proben das Methionin abgespalten worden war. Die Analyse erfolgte durch Sequenzierung der N-terminalen Aminosäuren nach Edman-Abbau. Hierbei ergab sich, dass noch 50% des LHCP aus den beiden BL21-Stämmen bzw. 25% aus JM101 Methionin als erste Aminosäure aufwies. Die Frage, ob bei den modifizierten Proteine Cystein die N-terminale Aminosäure war, konnte allerdings nicht geklärt werden, da Cystein in der HPLC kein Signal ergibt und somit nicht identifiziert werden konnte.

3.1.2 Markierungsbedingungen und Aufreinigung

Für die Markierung von PDI-TE mit R1Ch wurden im Folgenden nur IBs aus JM101 verwendet, da 75% dieser Proteine kein Methionin als N-terminale Aminosäure aufwiesen. Die Reaktion erfolgte mit dem vollständig denaturierten Protein, wobei GuHCl als denaturierendes Agens verwendet wurde. Für die anschließende Charakterisierung und Verwendung der markierten Proteine mussten diese anschließend in SDS-haltige Lösungen transferiert werden. Die üblicherweise durchgeführte saure Acetonfällung konnte hierbei allerdings nicht verwendet werden, da sich das Aceton nicht mit einer 8 M GuHCl-Lösung mischt und das Protein auf diese Weise nicht gefällt werden konnte. Stattdessen wurde der Markierungsansatz mit dem 9fachen Volumen an destilliertem Wasser verdünnt. Dabei wurde die Lösung trüb. Nach anschließender Zentrifugation erhielt man ein rosafarbenes Pellet in dem sich sowohl markiertes, als auch unmarkiertes Protein sowie noch freier Farbstoff befanden. Dieses Pellet wurde mehrmals in destilliertem Wasser resuspendiert, und nun war auch der Überstand nach Zentrifugation rosafarben, wobei sich die Färbung nach jedem Waschschrift verringerte. Nach der Auftrennung durch SDS-PAGE von einzelnen Waschfraktionen und dem anschließend in SDS-haltigem Puffer gelösten Pellet ergab die Coomassiefärbung nur im Pellet ein Signal und somit Protein, wobei auf derselben Höhe auch ein Fluoreszenzsignal beobachtet werden konnte (Abb. 3.3.2). Zusätzlich ergab sich in der Lauffront ein vergleichsweise geringes Fluoreszenzsignal, welches vermutlich auf freien Farbstoff zurückzuführen war, der sich noch in der Probe befand. Vergleichbare Signale wurden auch in den Waschfraktionen detektiert, wobei dieses im 3. Überstand am stärksten ausgeprägt war, im 4. Überstand dagegen nur noch sehr gering ausfiel.

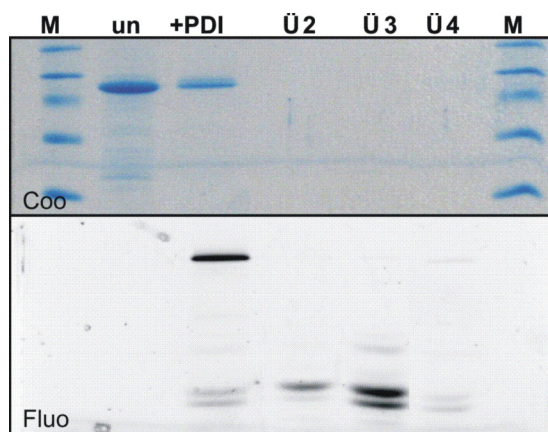


Abb. 3.3.2 Entfernung des GuHCl aus einem PDI-TE-Markierungsansatz.

Nach der Markierung wurde R1Ch-Apoprotein durch Verdünnung des Ansatzes mit Wasser gefällt und mehrmals mit Wasser gewaschen. Ausgewählte Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie- (Coo) und Fluoreszenzsignale (Fluo) sichtbar gemacht. Als Kontrolle dient unmarkiertes R1Ch-Apoprotein (un), M – Marker, +PDI – PDI-R1Ch nach GuHCl-Entfernung (Pellet in 1% SDS), Ü2-4 – 2.-4. Waschfraktion.

Durch die Verdünnung des Markierungsansatzes konnte somit zum einen GuHCl beseitigt werden, wodurch das Protein anschließend in SDS gelöst werden konnte, zum andern wurde in den Waschschriften freier Farbstoff entfernt, auch wenn dies nicht vollständig war und sich trotz eines fast farblosen Überstandes noch freier Farbstoff in der Proteinprobe befand.

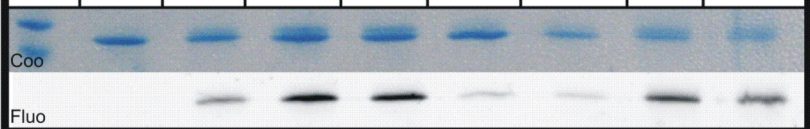
	M	un	PDI -R1Ch					
Überexpression („+“=An)			St	+	+	+	+	+
GuHCl -Konzentration („+“=8 M)			+	6 M	+	+	+	+
Zusatz („+“=Thiophenol)			+	+	+	TCP	+	+
Temperatur („+“=RT)			+	+	+	+	37 °C	37 °C
Molarer Dye -Überschuss („+“=1x)			+	+	+	+	+	5x
								
Markierungsausbeuten (in %)			27	30	29	15	20	45
Proteinausbeute (in %)			65	40	65	90	75	75

Abb. 3.3.3 Markierungs- und Proteinausbeuten nach unterschiedlichen Markierungsbedingungen von PDI-TE mit R1Ch.

Zur Optimierung der Markierung mit PDI-TE wurden R1Ch-IBs nach Standardüberexpression (St) bzw. nach Überexpression mit dem Rezept für Proteine mit N-terminalem Cystein (An) verwendet. Die Markierung erfolgte mit 6 M oder 8 M GuHCl unter Zugabe von Thiophenol oder TCyEP (TCP) bei Raumtemperatur (RT) oder im Brutschrank (37°C). Es wurden entweder äquimolare Mengen von PDI-TE und R1Ch verwendet (1x), oder ein 5fach molarer Überschuss an PDI-TE (5x). Die Bestimmung der Markierungsausbeute erfolgte durch die Coomassie- (Coo) bzw. Fluoreszenzsignale (Fluo) nach SDS-PAGE, die Proteinausbeute wurde anhand von Absorptionsspektren berechnet, M – Marker, un – unmarkierter R1Ch.

Für eine optimale Markierung wurden verschiedene Reaktionsbedingungen getestet, wobei nicht nur hohe Markierungs- sondern auch Proteinausbeuten erwünscht waren. Die verschiedenen Markierungsansätze wurden nach der Überführung in SDS-haltigen Puffer sowohl über SDS-PAGE als auch über Absorptionsspektren charakterisiert. Die Verwendung von R1Ch nach einer Standardüberexpression erbrachte dabei geringere Markierungsausbeuten als von R1Ch, welches nach dem Protokoll für N-terminale Cysteine exprimiert wurde (Abb. 3.3.3). Das Ausgangsprotokoll für die Markierung von Thioesterfarbstoffen mit N-terminalen Cysteinen sieht die Verwendung von 2 mM Protein in 6 M GuHCl-Lösung vor. R1Ch war allerdings nur mit einer Konzentration von 0,5 mM in 6 M GuHCl löslich. In 8 M GuHCl konnte dagegen eine Proteinkonzentration von 2 mM erreicht werden, wobei diese höhere Proteinkonzentration zu besseren Proteinausbeuten führte. Thiophenol wurde als Reaktionsbeschleuniger bei der Reaktion verwendet (Dawson et al., 1997). Es ist aber nur schlecht in GuHCl löslich und führt so zu Proteinaggregation und –verlust. Daher wurde untersucht, ob auch TCyEP als Reduktionsmittel seine Rolle während der Reaktion übernehmen kann. Zwar konnte dabei eine höhere Proteinausbeute beobachtet werden, die Markierungsausbeute war aber deutlich geringer. Der Versuch die Reaktion statt bei Raumtemperatur bei 37°C ablaufen zu lassen, hatte im Gegensatz zu einer erhöhten Farbstoffmenge keinen gravierenden Einfluss. Ein 5fach molarer Überschuss konnte dagegen die Markierungsausbeute von rund 30% auf 45% erhöhen.

Im Folgenden wurde daher standardmäßig die Reaktion in 8 M GuHCl unter der Verwendung von Thiophenol und einem 5fach molaren Farbstoffüberschuss bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei nur R1Ch-IBs verwendet wurden, die nach dem Protokoll für Proteine mit N-terminalem Cystein exprimiert worden waren.

Trotz der optimierten Markierung waren nur rund 45% der LHCP-Proteine mit PDI-TE markiert. Es bedurfte daher einer weiteren Aufreinigung, um markierte R1Ch von unmarkierten zu trennen und auf diese Weise eine nahezu vollständig markierte Proteinprobe zu erhalten. Nach Coomassiefärbung wiesen markierte R1Ch-Proben immer eine Doppelbande auf, wohingegen in Fluoreszenzmessungen nur ein Signal auf Proteinhöhe beobachtet werden konnte. Um dies näher zu untersuchen, wurden eine markierte und eine unmarkierte Probe durch SDS-PAGE aufgetrennt, wobei die Trennstrecke auf ein Maximum verlängert wurde. Nun konnte im Vergleich zum Fluoreszenzsignal das obere Coomassiesignal in der markierten Probe eindeutig PDI-R1Ch zugeordnet werden (Abb. 3.3.4 A). Dieses veränderte Laufverhalten konnte im Weiteren für eine Auftrennung von PDI-R1Ch und unmarkiertem R1Ch durch präparative Gelelektrophorese genutzt werden.

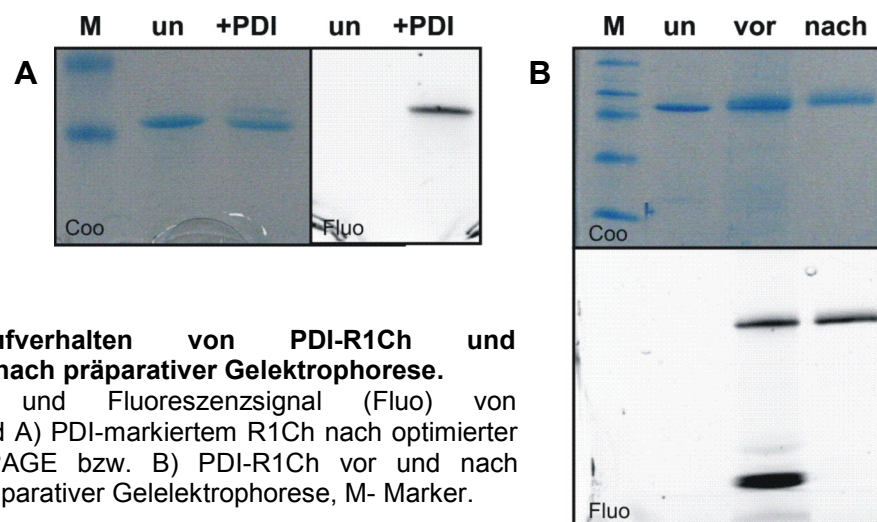


Abb. 3.3.4 Laufverhalten von PDI-R1Ch und Aufreinigungserfolg nach präparativer Gelelektrophorese.

Coomassie- (Coo) und Fluoreszenzsignal (Fluo) von unmarkiertem (un) und A) PDI-markiertem R1Ch nach optimierter Trennung mit SDS-PAGE bzw. B) PDI-R1Ch vor und nach Aufreinigung durch präparativer Gelelektrophorese, M- Marker.

Um den Erfolg der präparativen Gelelektrophorese zu bestätigen, wurden Proben vor und nach der Aufreinigung durch SDS-PAGE miteinander verglichen. Während die nicht aufgereinigte Probe zwei deutliche Proteinbanden in der Coomassiefärbung aufwies, konnte bei der Probe nach der präparativen Gelelektrophorese nur noch eine Bande beobachtet werden, die ein größeres apparentes Molekulargewicht als die unmarkierte Kontrolle hatte (Abb. 3.3.4 B). Die Analyse der Fluoreszenzsignale ergab zusätzlich, dass durch die präparative Gelelektrophorese auch der freie Farbstoff entfernt werden konnte. Die Markierungsausbeute in der aufgereinigten PDI-R1Ch Probe wurde durch densitometrische Auswertung der Coomassiesignale mit rund 80% bestimmt, die Berechnung anhand von Absorptionsspektren ergab dagegen einen Wert von 40%.

3.1.3 Rekonstitution und Energietransfer: Publikation II. Peneva et al. Site-specific incorporation of perylene into an N-terminal modified light-harvesting complex LHCII. [in Bearbeitung]

Site-specific incorporation of perylene into an N-terminal modified light-harvesting complex LHCII

Kalina Peneva^a, Kristina Gundlach^b, Andreas Herrmann^c, Harald Paulsen^b
and Klaus Müllen^a

^a Max Planck Institute for Polymer Research, Ackermannweg 10, 55128 Mainz, Germany,
Fax: + 496131 379350; E-mail: muellen@mpip-mainz.mpg.de

^b University of Mainz, Institute of General Botany, Müllerweg 6, 55099 Mainz, Germany

^c University of Groningen, Zernike Institute for Advanced Materials, Department of Polymer
Chemistry, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, Netherlands

Abstract

Employing the utility of the native chemical ligation, site-specific attachment of an ultrastable perylene dye to a derivative of the major light-harvesting complex (LHCII) was demonstrated. Biochemical analysis of the conjugate indicated that the structure and function of LHCII remain largely unaffected by the N-terminal modification and in addition efficient energy transfer was observed.

Introduction

Visualizing proteins using fluorescence and confocal laser scanning microscopy has enabled 3-dimensional imaging of protein dynamics and cellular events.^{1, 2} The broad utilization of fluorescent probes has led to better understanding of protein function and structure.³ Fluorescent molecules have been introduced into proteins by chemical modification of the reactive side chains of amino acids such as lysine and cysteine.⁴⁻⁷ Selective chemical modification of proteins, however, can be complicated by the presence of several reactive side chains in the protein. Labeling of the proteins at defined positions has offered the ability to monitor conformational dynamics and protein folding at ensemble and single-molecule level using fluorescence resonance energy transfer (FRET) between a single donor and a complementary acceptor.⁸⁻¹⁰ For this purpose the incorporation of the label in a controlled and site-specific way is crucial.¹¹

Numerous chemical methods have been introduced which can be used for site-selective modification of proteins. Native chemical ligation (NCL) is one of the most versatile coupling techniques developed to prepare larger protein structures, to selectively introduce a biophysical probe or to synthesize proteins that are difficult to express.¹²⁻¹⁵ It involves the chemoselective coupling of unprotected peptide segments, one containing a C-terminal thioester and the other containing an N-terminal cysteine residue. To adapt this powerful reaction for site-selective labeling of proteins with an ultrastable fluorophore, water-soluble perylenebis(dicarboximide) with a thioester functional group was synthesized. The perylenebis(dicarboximide)thioester (PDI-thioester) underwent reaction under standard “native chemical ligation” conditions with a derivative of the major light-harvesting complex (LHCII) protein containing an N-terminal cysteine.¹⁵

Experimental Section

General information

The solvents used are of commercial grade. Column chromatography was performed on silica gel (Geduran Si60, Merck). ^1H and ^{13}C NMR were recorded on Bruker Avance 250 and Bruker AMX 300. FD mass spectra were performed with a VG-Instruments ZAB 2-SE-FDP instrument. MALDI-TOF mass spectra were recorded on a Bruker MALDI-TOF spectrometer. UV/Vis spectra were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 9, fluorescence spectra on SPEX Fluorolog 3 spectrometer. Compound 1 was prepared as described in the literature.¹⁶ PAI-1 N-terminal cysteine was purchased from Oxford Biomedical Research, Inc.

N-(2,6-diisopropylphenyl)-*N'*-[*N*-(4-(benzylthio)-4-oxobutanoyl)aminoethyl]-1,6,7,12-tetra(4-sulfophenoxy)-perylene-3,4:9,10-tetracarboxydiimide

To a solution of *N*-(2,6-diisopropylphenyl)-*N'*-(2-aminoethyl)-1,6,7,12-tetra(4-sulfophenoxy)-perylene-3,4:9,10-tetracarboxydiimide (1) (50 mg, 0.040 mmol) in *N*-methylpyrrolidinone (NMP) was added thiolane-2,5-dione (6 mg, 0.052 mmol), followed by *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (10 mg, 0.080 mmol). After one hour, the reaction mixture was diluted with 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.2) and cooled to 4°C. Benzyl bromide (14 mg, 0.08 mmol) was added with thorough mixing and additionally reacted for 10 minutes. The product was purified using a Sep-Pak C18 cartridge (Millipore; pre-washed with 10 ml acetonitrile and 10 ml water; washed with 20 ml water; eluted with 1 ml 60 % methanol), dried and isolated as red solid in 50 % yield. ^1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 7.95 (s, 2 H, ArH), 7.91 (s, 2 H, ArH), 7.62 (m, 8H, ArH), 7.40 (t, J = 7.5 Hz, 1H, ArH), 7.29 (d, J = 7.5, 7H, ArH), 6.99 (d, J = 7.5, 4H, ArH), 6.96 (d, J = 7.5, 4H, ArH), 4.16 (s, 2H, CH_2SCO), 3.58 (t, J = 12.5, 2H, CH_2N), 3.08 (t, J = 15 Hz, 2H, CH_2NH), 2.68 (sept, J = 12.5 Hz, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.28 (t, J = 12.5 Hz, 2H, CH_2CO), 2.14 (t, J = 12.5 Hz, 2H, CH_2CO), 1.00 (d, J = 5 Hz, 12H, CH_3); ^{13}C -NMR (300 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): δ = 178.14 (SC=O), 174.02 (NHC=O), 171.55 (C=O), 162.94(C=O), 155.48, 155.27, 145.84, 145.24, 132.80, 132.43, 130.87, 128.14, 124.04, 123.69, 122.86, 120.33, 119.33, 53.75 (CH_2S), 48.79 (CH_2N), 42.07 (CH_2N), 36.52 (CH_2CO), 30.42 (CH_2CO), 24.08 ppm; UV-Vis (H_2O): λ_{max} (ϵ) = 452 (10 643), 536 (19 080), 568 (23 401); Fluorescence (H_2O , excitation 568 nm) λ_{max} = 622 nm

Preparation of the N-terminal Cys LHCII derivative

A bacterially expressed apoprotein derivative of *Lhcb1*2* (AB80) from *Pisum sativum*¹⁷ was used, which contained a single Cys at position 1 (the amino acid numbering of Kühlbrandt et al.¹⁸ is used in which the leading methionine is not counted) as well as a hexahistidyl (His₆) tag at the C terminus. This derivative was created by two point mutations in the construct

C3.2h, coding for the mature protein with a C terminal His₆ tag,¹⁹ by using the QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA). The native Cys79 was exchanged for Ser; the native Arg1 for Cys.

The proteins were overexpressed in *Escherichia coli* as described earlier.²⁰ Bacteria harboring the LHCP were grown over night in 50 ml Luria-Bertani medium (1 % (w/v) Bactotryptone, 0.5 % (w/v) Bacto-yeast extract, 1 % (w/v) NaCl) containing 100 µg/ml ampicillin. Of this overnight culture, 20 ml were used to inoculate 400 ml LB-medium. The culture was grown at 37°C and 200 rpm for 3 h ($A_{600} = 0.75$) until protein expression was induced by adding 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). To protect the N-terminal Cys 4 ml of a freshly prepared 1 M cysteine stock (pH 7.0) were added 2 h prior to, and another 2 ml at the time of IPTG addition. Subsequently, the culture was incubated another 2 h at 37°C and 200 rpm. The expressed protein was isolated as inclusion bodies as described earlier²¹ except that 10 mM methyl methanethiosulfonate was added to all buffers.

Cleavage of the leading methionine in the isolated protein sample was determined by N-terminal Edman degradation resulting in phenylthiohydantoin amino acids. Determination of the amino acids in each degradation cycle was performed by HPLC analysis using a reversed-phase C-18 column and detection at 270 nm in comparison to known amino acid standards.

Labeling of LHCII apoprotein with PDI-thioester

For labeling, the proteins were dissolved in 8 M Gn-HCl, 80 mM sodium phosphate (pH 7.5) and 4 % (v/v) thiophenol to a final protein concentration of 2 mM. A 5-fold molar excess of PDI-thioester was dissolved in the protein solution and the sample was incubated at room temperature for 24 hours. The protein was precipitated by diluting the sample 25-fold with water, collected by centrifugation (22000 x g for 5 min), washed several times with water until the supernatant stayed colorless, and finally dissolved in 2 % (w/v) sodium dodecyl sulfate and 100 mM Tris buffer pH 9.0. Labeled protein was separated from non-labeled protein by preparative gel electrophoresis using a Mini Prep Cell (Biorad, USA).

Reconstitution of recombinant LHCII and trypsin digestion

Total pigment extract, Chl *a* and *b*, and carotenoids were isolated from pea thylakoids.²² Unlabeled and labeled LHCII apoproteins were reconstituted to monomeric pigment-protein complexes by the detergent exchange method.²³ For separation of complexes from unbound pigments and unfolded protein, the reconstitution solution was centrifuged through a sucrose gradient as described earlier.²⁴

Trypsin (Roche, Germany) was dissolved in 10 mM Tricine pH 8.0 and 0.2 mM EDTA to a final concentration of 1 mg/ml. For proteolytic digestion, reconstituted LHCII samples were

mixed with trypsin solution to a final trypsin concentration 0.1 mg/ml and incubated for 30 min on ice.

Spectral measurements

Fluorescence measurements ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ and 550 nm) were recorded with a Fluoromax-2 spectrometer (Jobin Yvon, Germany). LHCII samples to be measured were diluted to 37 nM ($A_{670} = 0.02$). Fluorescence emission spectra were corrected for the wavelength-dependence of the fluorimeter. The energy transfer rate was calculated on the basis of donor fluorescence quenching in the presence of the acceptor. Emission spectra of trypsin digested and undigested PDI-LHCII were measured with the excitation wavelength set to 550 nm, the absorption maximum of the donor dye PDI. The spectra were deconvoluted, and the components representing the dye contribution to the measured spectra were integrated.

SDS gel electrophoresis

For gel electrophoresis samples were denatured in denaturing buffer (1.3 % SDS, 0.5 M β -mercaptoethanol, 8 % glycerol, 33 mM Tris buffer pH 6.8, 7 mM bromophenol blue) for 2 min at 100°C . Protein aliquots were loaded on 15 % acrylamide gels. Fluorescence of unstained gels upon excitation with UV-light as well as densitometric analysis were realised with the VersaDoc imaging system 3000 (BioRad, Germany). Proteins were stained by Coomassie Brilliant Blue following standard protocols.

Determination of Förster distances

The Förster distance (R_0) of PDI-thioester to Chl *a* and Chl *b* was calculated with the following equation²⁵

$$R_0 = 0.211 [\kappa^2 * \eta^{-4} * \varphi_F * J(\lambda)]^{1/6} \text{ \AA} \quad (1)$$

Here κ^2 is the orientation factor, η the refractive index of the solvent, φ_F the fluorescence quantum yield of the donor (PDI-thioester) and $J(\lambda)$ the overlap integral between donor emission and acceptor absorption spectra. As a first approximation $\kappa^2 = 2/3$ (for randomly oriented dipole moments) and $\eta = 1.54$ refractive index for protein environment were used.²⁶

The overlap integral was calculated with

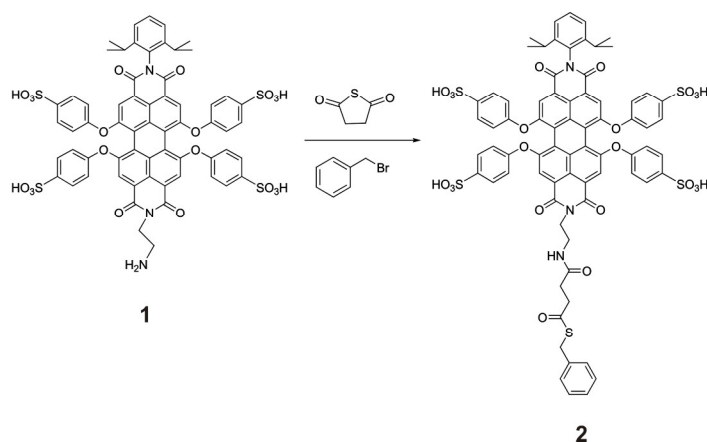
$$J(\lambda) = [\int F_D(\lambda) * \epsilon_A * \lambda^4 d\lambda] / [\int F_D(\lambda) d\lambda] \text{ mol}^{-1} * \text{l}^{-1} * \text{cm}^{-1} * \text{nm}^4 \quad (2)$$

F_D is the fluorescence intensity of the donor (PDI-thioester), ϵ_A the molar extinction coefficient of the acceptor (Chl) and λ the wavelength.²⁵

Results and discussion

Different classes of chromophores have been synthesized and utilized for site-specific labeling of proteins, cells and other biomolecules.^{11, 27-31} For an increasing number of applications the photostability of the label is crucial. The perylenebis(dicarboximide)s have proven to be an exceptional class of chromophores possessing excellent thermal and photochemical stabilities. Their unique sets of photophysical properties have provoked many studies in the area of single molecule spectroscopy. They have been used efficiently as label in single enzyme tracking using real time wide field microscopy of single phospholipases.^{16, 32-35} The nitrilo-triaceticacid-functionalized perylenebis (dicarboximide) has shown an unexpected behavior in the presence of nickel ions since no change in the quantum yield was observed.³³

However, so far no derivative of the rylenebis(dicarboximide) series is known to exhibit an appropriate functionality for covalently labeling either the N- or C terminus of proteins selectively. Therefore, we decided to synthesize a water soluble perylenebis(dicarboximide) functionalized as a thioester to achieve covalent attachment to an N-terminal cysteine of proteins. Water-soluble perylene diimide containing a primary amine group was prepared as described in the literature.¹⁶ Monofunctionalized perylene diimide (1) (Scheme 1) was reacted with thiolane-2,5-dione, and subsequent addition of benzyl bromide at slightly acidic conditions resulted in the formation of thioester 2 in 50 % yield. Applying the procedure



described by Pannel et al. for conversion of succinimidyl ester of the chromophore via activation of benzyl mercaptan with trimethylaluminium did not lead to the formation of the target compound 2.³⁶

Scheme 1. Preparation of PDI-thioester 2 via reaction with thiolane-2,5-dione and subsequent addition of benzyl bromide.

The PDI-thioester 2 exhibits excellent solubility in water, an absorption maximum at 568 nm ($\epsilon = 23\,400\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) and an emission maximum at 622 nm. The PDI-thioester 2 shows high fluorescence quantum yield (Φ_f) of 54 % in aqueous medium measured at room temperature using Cresyl Violet as a reference.²⁵ Normalized absorbance and fluorescence spectra of the chromophore are shown in Figure 1.

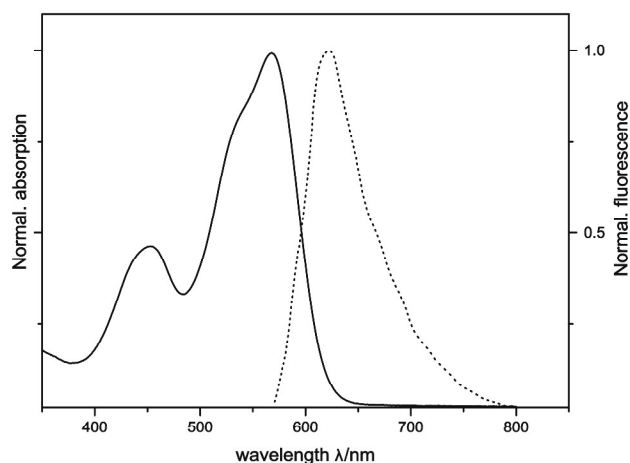


Figure 1. Normalized absorption (solid line) and emission (dotted line) spectra of 2 in aqueous medium.

To prove the suitability of PDI-thioester for protein labeling, the dye was attached to a derivative of LHCII containing an N-terminal cysteine. LHCII is the major light-harvesting complex in the photosynthetic apparatus of higher plants, non-covalently binding eight chlorophyll (Chl) *a*, six Chl *b*, and four carotenoids (lutein, neoxanthin, violaxanthin). It assembles in vitro from the denatured, bacterially expressed apoprotein and plant pigments, and the functionality of the refolded complex can easily be tested by spectroscopic measurements.³⁷⁻³⁹ Therefore possible restrictions due to PDI-thioester binding in the protein structure can be investigated.

For bacterial expression of a recombinant protein with an N-terminal cysteine, several problems have to be overcome. Bacterial proteins are always synthesized with a leading methionine which in some cases is removed by endogenous enzymes; therefore, conditions had to be found in which methionine removal was as complete as possible. The cleavage depends on the bacteria strain and the properties of the following amino acid.⁴⁰ To avoid N-terminal modifications of the protein either at the amino or the sulfhydryl group, which both would impair the reaction with the thioester dye, the growth medium contained cysteine and methyl methanethiosulfonate according to Gentle et al.²⁰ Analysis of the N-terminal amino acids by Edman degradation indicated that an estimated 25 % of the protein still contained methionine as its first amino acid.

Labeling of this protein sample with PDI-thioester was performed according to the native chemical ligation procedure.⁴¹ Under these conditions transesterification of PDI-thioester with the Cys thiol of the protein occurs, followed by an S-N acyl shift to generate the conjugate that exhibits a stable amide bond. To confirm successful labeling, samples were analyzed by SDS PAGE. N-terminally labeled PDI-LHCII was seen on the unstained electrophoresis gel as a fluorescent band (Figure 2, lower panel lane 2). Upon Coomassie staining of the protein, two bands became visible (Figure 2, upper panel lane 2). Superimposition of the stained and unstained gel (not shown) revealed that the upper band in the double band corresponds to the fluorescent one; the other one representing non-labeled LHCII apoprotein. By comparing the amount of Coomassie stain in the two bands, the yield of PDI labeling was estimated to

be 40 %. Labeled LHCII was separated from unlabeled material by preparative gel electrophoresis taking advantage of the reduced mobility of the PDI-labeled protein in a denaturing SDS gel. In the purified material, about 80 % of the protein was labeled (Figure 2 A).

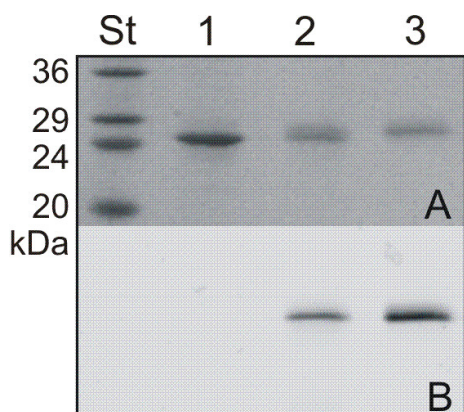


Figure 2. Labeling efficiency can be calculated by gel electrophoresis. Equal amounts of unlabeled (1) and labeled LHCII prior to (2) and after (3) further purification. Protein signals were visualized by Coomassie staining (A) and fluorescence upon excitation by UV-light (B). St – protein standard.

The PDI-labeled protein could be folded and assembled with pigments by following the standard reconstitution procedure. The best functional test for recombinant LHCII is the intramolecular energy transfer from Chl *b* to Chl *a*.³⁷⁻³⁹ The fluorescence of PDI-labeled LHCII is shown (Figure 3) upon excitation at 470 nm, near the absorption maximum of Chl *b*. Fluorescence emission is seen mostly around 680 nm, the emission wavelength of Chl *a*, and only very little around 660 nm where Chl *b* emits. This shows that in PDI-labeled LHCII,

most of the excitation energy is transferred from Chl *b* to Chl *a*, demonstrating that these complexes are functional. Proper folding and assembly of labeled LHCII was further verified by excitation and CD spectra (supporting information).

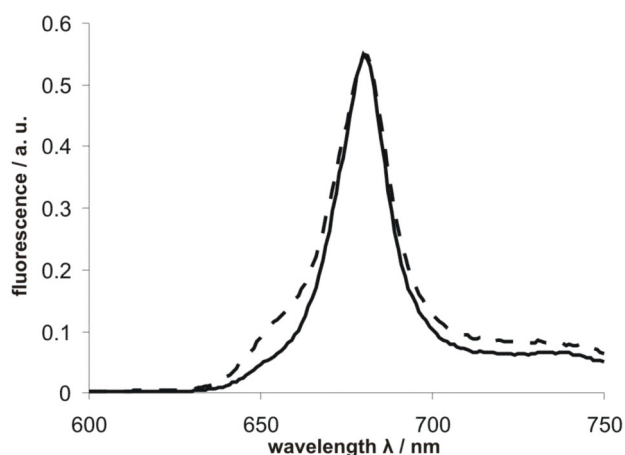


Figure 3: Folded PDI-LHCII is functional. Emission spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) of LHCII with (dashed line) and without PDI-thioester (solid line). Concentration of LHCII was always 37 nM.

To test whether the PDI dye was in fact specifically coupled to the N terminus of the LHCII protein, rather than being non-specifically attached to the pigment-protein complexes, the latter were treated with the serine protease trypsin and then the apoprotein was analyzed by gel electrophoresis (Figure 4). Non-pigmented LHCII apoprotein is digested by trypsin into fragments too small to be visible on the gel, whereas in the correctly assembled pigment-protein complex, most of the protein is protected from protease access and only 8 N-terminal amino acids are cleaved off.^{23, 42} The band just below the trypsin band at 24 kDa in Figure 4 represents this N-terminally shortened LHCII apoprotein. When the PDI-labeled LHCII (right-

hand lanes) was treated with trypsin (lane “+T”), PDI fluorescence disappeared completely. This demonstrates that the fluorophore is specifically attached to the N terminus of the LHCII apoprotein.

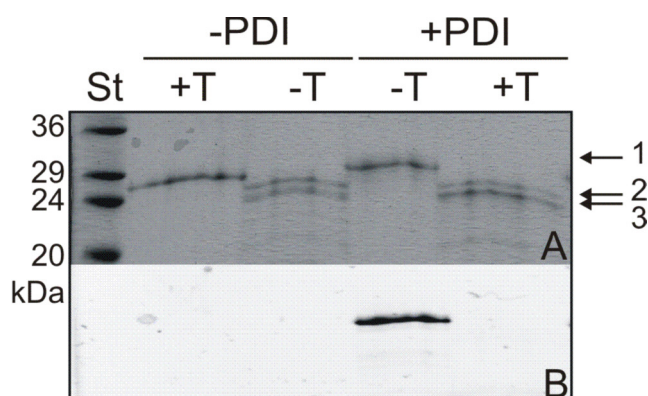
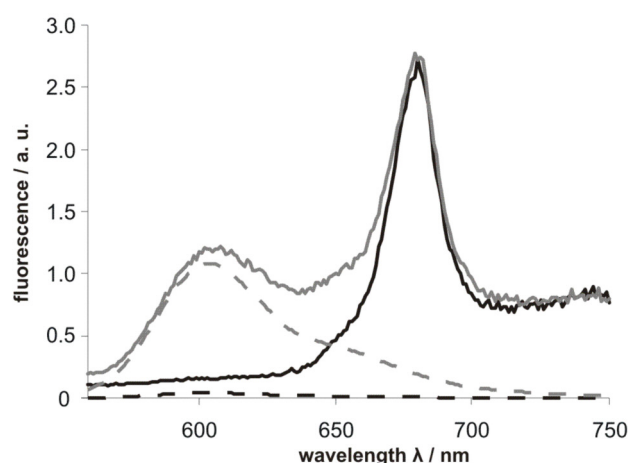


Figure 4: Labeling position of PDI is at the N-terminus. Equal amounts of labeled and unlabeled LHCII with and without trypsin digestion were separated from pigments by denaturing gel electrophoresis. Protein signals were visualized by Coomassie staining (A) and fluorescence after excitation with UV-light (B). - PDI – unlabeled, + PDI – labeled, -T/+T – without/with trypsin digestion, St – protein standard, 1 – undigested LHCII, 2- trypsin, 3 – digested LHCII.

Since the PDI-labeled LHCII protein contained a small amount of unlabeled protein, it needed to be shown that it was in fact the labeled material that successfully folded into functional LHCII. This was proven by efficient energy transfer between the dye and LHCII. As the emission spectrum of PDI-thioester and the absorption spectrum of LHCII chlorophylls overlap, the chromophores can potentially engage in FRET. The critical Förster distance between PDI-thioester and Chl *a* or Chl *b* is 5.2 nm and 5.0 nm, respectively. With the maximum radius of LHCII being approximately 6 nm⁴³, PDI and Chls are expected to be close enough in the labeled LHCII for efficient FRET to take place. To test this, emission spectra with excitation near the PDI absorption maximum (550 nm) were measured of trypsin-digested and non-digested PDI-LHCII. Undigested samples did not show any



significant PDI fluorescence but did show LHCII fluorescence at 680 nm. On the other hand, in digested samples both LHCII and PDI fluoresced (Figure 5).

Figure 5: Energy transfer measurements. Emission spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 550$ nm) of PDI-LHCII with (solid gray line) and without (solid black line) trypsin digestion. Concentration of LHCII was always 37 nM. PDI fluorescence before (dashed black line) and after (dashed gray line) trypsin digestion were fitted by deconvolution.

The most likely explanation is that in PDI-labeled LHCII, the dye transfers virtually all of its excitation energy to the LHCII Chls. As soon as the N-terminal amino acids are cleaved off, the dye becomes uncoupled from the acceptor Chls and resumes emission at around 600 nm. The Chls still emit because of their co-excitation at 550 nm. Assuming that neither the extinction coefficient nor the fluorescence quantum yield of the donor dye are affected by

trypsin cleavage, the amount of donor quenching indicates an energy transfer efficiency of at least 96 %. However, no commensurate sensitized acceptor (chlorophyll) emission is observed prior to trypsin cleavage. Therefore, other mechanisms leading to PDI quenching in the pigmented protein cannot be excluded.

Native chemical ligation of N-terminal cysteine LHCII and PDI-thioester as presented here was successful as verified by SDS PAGE. The unexpectedly low labeling yield of 40 % is due in part to the fact that 25 % of the protein to be labeled started with a Met instead of the required Cys. Part of the remaining 75 % may have been shortened at its N terminus by more than one amino acid, or the SH- or NH₂-group of the leading Cys may have been modified in spite of the precautions taken (addition of cysteine and methyl methanethiosulfonate).^{20, 40} Trypsin digestion proved that the dye was covalently attached within the 8 N-terminal amino acids. Taking into account the labeling mechanism by native chemical ligation, this implies that one dye per protein is bound to the leading Cys residue. All spectroscopic and biochemical analyses of PDI-LHCII indicate that the structure and function of LHCII remain largely unaffected by the N-terminal modification. This is not unexpected since functional recombinant LHCII has also been obtained after removing the entire N-terminal hydrophilic protein domain or attaching fluorescent dyes or spin labels to a Cys at position 3.⁴⁴⁻⁴⁷ The only notable spectroscopic difference between PDI-LHCII and native LHCII is a Chl *b* shoulder in the emission spectrum of the labeled complex upon exciting Chl *b* (Figure 3), indicating that a small percentage of Chl *b* present is unable to transfer its excitation energy to Chl *a*.

Most likely, this is not due to imperfect folding but rather to dissociation of a small fraction of the pigment-protein complexes. Monomeric LHCII is intrinsically less stable than the trimeric form and easily dissociates in aqueous detergent solution, particularly at the low concentrations used here for fluorescence measurements. We anticipate that trimeric PDI-LHCII (which has not been studied here) exhibits complete energy transfer from Chl *b* to Chl *a*.

The fluorescence of the thioester is efficiently quenched by its attachment to LHCII. One possible reason is a decrease of the quantum yield upon protein binding. However, upon trypsin digestion, PDI-thioester fluorescence is fully restored although PDI is still attached to an 8-amino acid peptide. Also, PDI attached to the full-length LHCII apoprotein in SDS solution is fully fluorescent, evident for instance by the strongly fluorescent protein band in SDS PAGE (Figure 2). PDI quenching is only visible in LHCII where it can be due either to energy transfer to the chlorophylls or the molecular environment provided by the folded protein. The latter is unlikely since the labeling position at the very N terminus is separated from the folded protein body by the long, little structured hydrophilic N-terminal domain.⁴⁸

Therefore, energy transfer is more probably the explanation for PDI quenching although this is not confirmed by a concomitant increase in acceptor (Chl) emission.

Conclusions

There is only a limited number of proteins possessing a starting Cys, however, for bacterially expressed recombinant proteins it provides an excellent possibility to attach PDI, or other dyes containing a thioester function, highly specifically to the N terminus of recombinant proteins. Recombinant proteins can easily be engineered such that they contain Cys in position 2. Additional Cys residues elsewhere in the protein do not disturb the procedure because only N-terminal cysteine is susceptible to native chemical labeling. Removal of the leading methionine in the expressing bacteria can be stimulated according to Gentle.²⁰ Where preparative gel electrophoresis is not suitable for isolating the labeled protein, an alternative possibility would be affinity chromatography using a sulfhydryl-binding matrix, provided the N-terminal cysteine is the only one in the protein. In this case; only the non-reacted protein would bind to the affinity column leaving the labeled material in the run-through. Thus, the labeling procedure described in this paper can be extended to a large number of very different proteins.

Notes and references

This work was supported by the Volkswagen Foundation (I/82 072). The authors would like to thank Friedrich Lottspeich, Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany for sequencing.

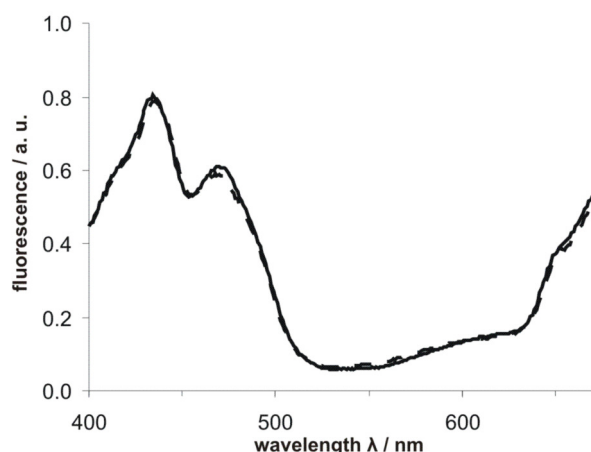
1. D. A. Agard, Y. Hiraoka, P. Shaw and J. W. Sedat, *Methods in Cell Biology*, 1989, 30, 353-377.
2. X. S. Xie and R. C. Dunn, *Science*, 1994, 265, 361-364.
3. J. W. Lichtman and J. A. Conchello, *Nature Methods*, 2005, 2, 910-919.
4. H. Jung, R. Lopez, C. Altenbach, W. L. Hubbell and H. R. Kaback, *Biophys. J.*, 1993, 64, A14-A14.
5. M. R. Eftink, C. A. Ghiron, R. A. Kautz and R. O. Fox, *Biochemistry*, 1991, 30, 1193-1199.
6. J. Brunner, *Annu. Rev. Biochem.*, 1993, 62, 483-514.
7. V. W. Cornish, D. R. Benson, C. A. Altenbach, K. Hideg, W. L. Hubbell and P. G. Schultz, *PNAS*, 1994, 91, 2910-2914.
8. E. A. Lipman, B. Schuler, O. Bakajin and W. A. Eaton, *Science*, 2003, 301, 1233-1235.
9. B. Schuler, E. A. Lipman and W. A. Eaton, *Nature*, 2002, 419, 743-747.
10. J. A. Schmid and A. Birbach, *Thromb. Haemostasis*, 2007, 97, 378-384.
11. T. L. Foley and M. D. Burkart, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2007, 11, 12-19.

12. P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clarklewis and S. B. H. Kent, *Science*, 1994, 266, 776-779.
13. V. Muralidharan and T. W. Muir, *Nature Methods*, 2006, 3, 429-438.
14. R. R. Flavell and T. W. Muir, *Acc. Chem. Res.*, 2009, 42, 107-116.
15. P. E. Dawson and S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.*, 2000, 69, 923-960.
16. K. Peneva, G. Mihov, F. Nolde, S. Rocha, J.-i. Hotta, K. Braeckmans, J. Hofkens, H. Uji-i, A. Herrmann and K. Müllen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47, 3372-3375.
17. A. R. Cashmore, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1984, 81, 2960-2964.
18. W. Kuhlbrandt, D. N. Wang and Y. Fujiyoshi, *Nature*, 1994, 367, 614-621.
19. K. Kosemund, I. Geiger and H. Paulsen, *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267, 1138-1145.
20. I. E. Gentle, D. P. De Souza and M. Baca, *Bioconjugate Chem.*, 2004, 15, 658-663.
21. H. Paulsen, U. Rumler and W. Rudiger, *Planta*, 1990, 181, 204-211.
22. P. J. Booth and H. Paulsen, *Biochemistry*, 1996, 35, 5103-5108.
23. H. Paulsen, B. Finkenzeller and N. Kuehle, *Eur. J. Biochem.*, 1993, 215, 809-816.
24. S. Hobe, S. Prytulla, W. Kuehlbrandt and H. Paulsen, *EMBO J.*, 1994, 13, 3423-3429.
25. J. R. Lakowicz, *Principles of Photoluminescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, Dordrecht, 1999.
26. K. Sauer, H. Scheer and P. Sauer, *Photochem. Photobiol.*, 1987, 46, 427-440.
27. C. Lefevre, H. C. Kang, R. P. Haugland, N. Malekzadeh, S. Arttamangkul and R. P. Haugland, *Bioconjugate Chem.*, 1996, 7, 482-489.
28. B. A. Griffin, S. R. Adams and R. Y. Tsien, *Science*, 1998, 281, 269-272.
29. H. Ma, W. Shi, S. Dong, K. Wang, J. Jia and S. Chen, *Curr. Chem. Biol.*, 2008, 2, 249-255.
30. B. Krishnan, A. Szymanska and L. M. Gierasch, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2007, 69, 31-40.
31. I. Chen and A. Y. Ting, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2005, 16, 35-40.
32. K. Peneva, A. Herrmann and K. Müllen, ed. 2062944, (Max-Planck-Gesellschaft zur Foerderung der Wissenschaften e.v., Germany). EP 2009, p. 39.
33. K. Peneva, G. Mihov, A. Herrmann, N. Zarrabi, M. Börsch, T. Duncan and K. Müllen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 5398-5399.
34. S. Rocha, J. A. Hutchison, K. Peneva, A. Herrmann, K. Müllen, M. Skjot, C. I. Jorgensen, A. Svendsen, F. C. De Schryver, J. Hofkens and H. Uji-i, *ChemPhysChem*, 2009, 10, 151-161.
35. C. Jung, N. Ruthardt, R. Lewis, J. Michaelis, B. Sodeik, F. Nolde, K. Peneva, K. Müllen and C. Braeuchle, *ChemPhysChem*, 2009, 10, 180-190.
36. B. Schuler and L. K. Pannell, *Bioconjugate Chem.*, 2002, 13, 1039-1043.
37. R. Simonetto, M. Crimi, D. Sandona, R. Croce, G. Cinque, J. Breton and R. Bassi, *Biochemistry*, 1999, 38, 12974-12983.
38. D. Reinsberg, P. J. Booth, C. Jegerschoeld, B. J. Khoo and H. Paulsen, *Biochemistry*, 2000, 39, 14305-14313.
39. Y. Zhang, C. Liu, S. Liu, Y. Shen, T. Kuang and C. Yang, *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, 1777, 479-487.
40. P. H. Hirel, J. M. Schmitter, P. Dessen, G. Fayat and S. Blanquet, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1989, 86, 8247-8251.

41. P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis and S. B. H. Kent, *Science* 1994, 266, 776-779.
42. S. Nussberger, K. Dorr, D. N. Wang and W. Kuhlbrandt, *J. Mol. Biol.*, 1993, 234, 347-356.
43. R. Standfuss, A. C. T. van Scheltinga, M. Lamborghini and W. Kuhlbrandt, *EMBO J.*, 2005, 24, 919-928.
44. H. Paulsen and S. Hobe, *Eur. J. Biochem.*, 1992, 205, 71-76.
45. H. Wolf-Klein, C. Kohl, K. Müllen and H. Paulsen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, 41, 3378-3380.
46. K. Gundlach, M. Werwie, S. Wiegand and H. Paulsen, *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, 1787, 1499-1504.
47. C. Dockter, A. Volkov, C. Bauer, Y. Polyhach, Z. Joly-Lopez, G. Jeschke and H. Paulsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, 106, 18485-18490.
48. J. Standfuss and W. Kuhlbrandt, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 36884-36891.

Supporting information

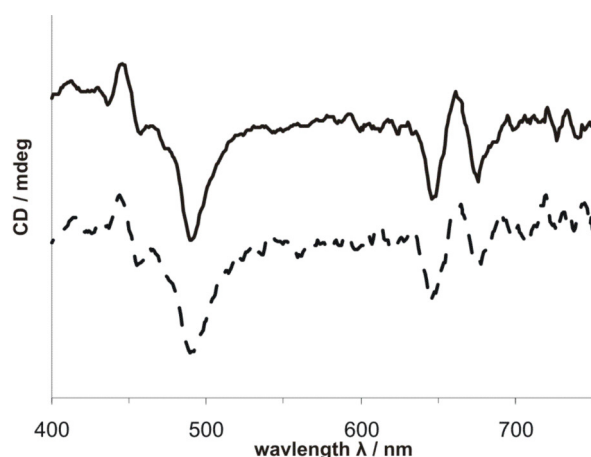
Proper folding and assembly of unlabeled and labeled LHCII was further supported by fluorescence excitation and CD spectra. Excitation spectra with the emission wavelength set to 680 nm, the fluorescence maximum of Chl *a* (Fluoromax-2 spectrometer, Jobin Yvon, Germany), revealed no difference between unlabeled LHCII and PDI-LHCII (Fig S1). This indicates, that all bound pigments in both complexes transfer their energy equally efficiently to the final energy acceptor Chl *a*. The PDI contribution to the excitation spectrum of labeled LHCII is hardly visible. This is due to the low extinction coefficient of PDI in comparison to the 14 Chl molecules in LHCII. The absorption maxima differ by a factor of about 20, and even at



the excitation wavelength 550 nm, far away from the absorption maximum of Chls, the latter still absorb more by a factor of 3.

Figure S1: Energy transfer in LHCII is not impaired by labeling. Excitation spectra ($\lambda_{em} = 680$ nm) of unlabeled (solid line) and labeled (dashed line) LHCII. Spectra were normalized at 400 nm, absorption of LHCII never exceeded 0.05.

CD spectra were measured with a J-810-S spectropolarimeter (Jasco, Germany). Recombinant LHCII exhibits the same CD signals as native LHCII.^{1, 2} The CD signals of LHCII are due to a multitude of pigment-pigment interactions and can therefore be used as a



fingerprint of correctly assembled LHCII with a correctly folded apoprotein.³ Comparison of the CD spectra of labeled complexes with those of the non-labeled ones also confirmed proper protein folding and assembly (Fig S2).

Figure S2: Protein folding is not impaired by labeling. CD spectra of labeled (dashed line) and unlabeled (solid line) LHCII. Spectra were normalized at 490 nm.

1. H. Paulsen, U. Rüdiger and W. Rudiger, *Planta*, 1990, **181**, 204-211.
2. S. Hobe, S. Prytulla, W. Kuehlbrandt and H. Paulsen, *EMBO J.*, 1994, **13**, 3423-3429.
3. S. Georgakopoulou, G. van der Zwan, R. Bassi, R. van Grondelle, H. van Amerongen and R. Croce, *Biochemistry*, 2007, **46**, 4745-4754.

3.2 PDI-NTA: Nachweis eines „His-Tags“ in einem SDS-PA-Gel

Mit dem wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff PDI-NTA sollte die Möglichkeit untersucht werden, auf schnelle Art und Weise und ohne Western Blot „His-Tag“-Proteine in einem PA-Gel zu detektieren. Hierfür wurden LHCII-Mutanten ohne bzw. mit unterschiedlichen „His-Tags“ durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele anschließend mit PDI-NTA für 30 min inkubiert, wobei der pH-Wert entweder bei 7,5 oder 8,5 lag. Nach der Inkubation wurden die Gele fünfmal für 5 min mit Wasser gewaschen und zwischen den Waschschritten jeweils Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Direkt nach der Inkubation konnte kein eindeutiges Fluoreszenzsignal detektiert werden, im Gegenteil schien es, als ob das gesamte Gel fluoreszieren würde. Nach 25minütigem Waschen war das Fluoreszenzsignal dagegen in den meisten Durchgängen am deutlichsten ausgeprägt, während ohne Inkubation mit PDI-NTA gar keine Signale detektiert wurden (Abb. 3.3.5). Es fiel dabei auf, dass nach einer Inkubation bei pH 8,5 die Signale trotz gleicher Proteinmengen stärker waren als nach der Inkubation bei pH 7,5. Interessanterweise waren die detektierten Signale anders als erwartet. Während normalerweise markierte Proben fluoreszieren – und daher im invertierten Bild eine dunkle Bande hervorrufen – zeigte sich bei diesen Versuche eine helle Bande und somit eher eine „Absorption“ des Lichtes. Die Signalstärke war abhängig vom verwendeten LHCII-Klon. Während D7f3 (wt) keinen „His-Tag“ aufweist und auch das geringste Signal hervorruft, scheint das Signal bei C3.2h (C-terminaler „His₆-Tag“) geringer zu sein als bei S106Ch (N-terminaler „His₆-Tag“), welches wiederum geringer war als bei S3Chh (N-terminaler „His₁₂-Tag“). Diese Unterschiede sind bei pH 7,5 deutlicher auszumachen, als bei pH 8,5. Zusätzlich zeigen die Proteine im Marker deutliche Fluoreszenzsignale.

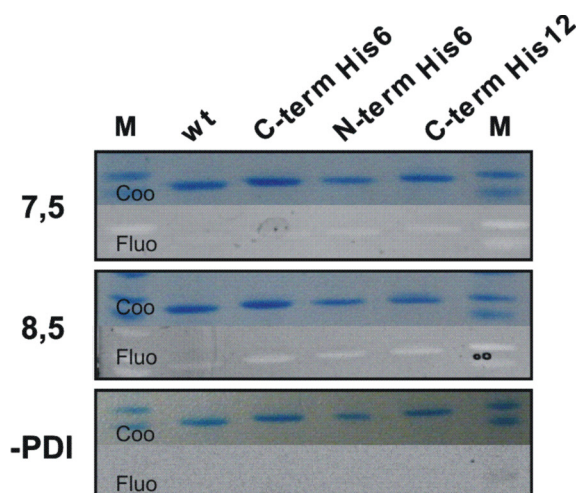


Abb. 3.3.5 Interaktion von PDI-NTA mit verschiedenen LHCII-Mutanten.

Coomassie- (Coo) und Fluoreszenzsignale (Fluo) nach 25-minütigem Waschen von verschiedenen LHCII-Apoproteinen nach Auftrennung durch SDS-PAGE und Inkubation mit PDI-NTA bei pH 7,5 bzw. 8,5, bzw. ohne Inkubation mit PDI-NTA (-PDI), M – Marker, wt – D7f3, C-term His6 – C3.2h, N-term His6 – S106Ch, C-term His12 – S3Chh.

Somit konnten „His-Tag“-Protein durch Inkubation mit PDI-NTA in SDS-Gelen detektiert werden, die optimale Dauer der Waschschriffe nach Inkubation konnte jedoch nicht eindeutig bestimmt werden. Die Signalstärke hing außerdem von der Lage des „His-Tags“ und dem pH während der Markierung ab.

4 Charakterisierung von QDs in wässriger Lösung

Zusätzlich zu Hybridkomplexen aus LHCII und Fluoreszenzfarbstoffen wurden in dieser Arbeit auch Interaktionsversuche mit Quantum Dots (QD) und LHCII durchgeführt. Als anorganische Materialien werden QDs in den meisten Fällen in organischen Lösungsmitteln gelöst. Für Versuche mit LHCII mussten die QDs jedoch in wässrigen Puffersystemen verwendet werden. Hierbei stellte sich zum einen die Frage, wie stabil die Eigenschaften der QDs in wässriger Lösung sind, zum anderen sollte der Einfluss der Pufferkomponenten auf die QDs untersucht werden.

4.1 Spektroskopische Eigenschaften der verwendeten QDs

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene QDs verwendet, die jeweils in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Basché am Institut für Physikalische Chemie der Universität Mainz hergestellt wurden (vgl. II3). Beide Arten gehören in die Gruppe der Typ I-QDs und besaßen einen Kern aus CdSe, der jedoch von unterschiedlichen schützenden Hüllschichten umgeben war. Bei den Multishell-QDs wurden diese aus einem CdS-ZnS-Gradienten gebildet, wobei sich an der QD-Oberfläche ZnS befand. Analog zum Namen bestanden die Hüllschichten bei 6xZnS-QDs dagegen aus sechs Schichten reinen ZnS. Die Wasserlöslichkeit wurde bei beiden Arten durch entsprechende Liganden auf der Oberfläche gewährleistet. Auch hier fanden mit Dihydro-Liponsäure (DHLA) und D-Penicillamin (DPA) zwei verschiedene Anwendung. Somit konnte zwischen vier QD-Arten unterschieden werden.

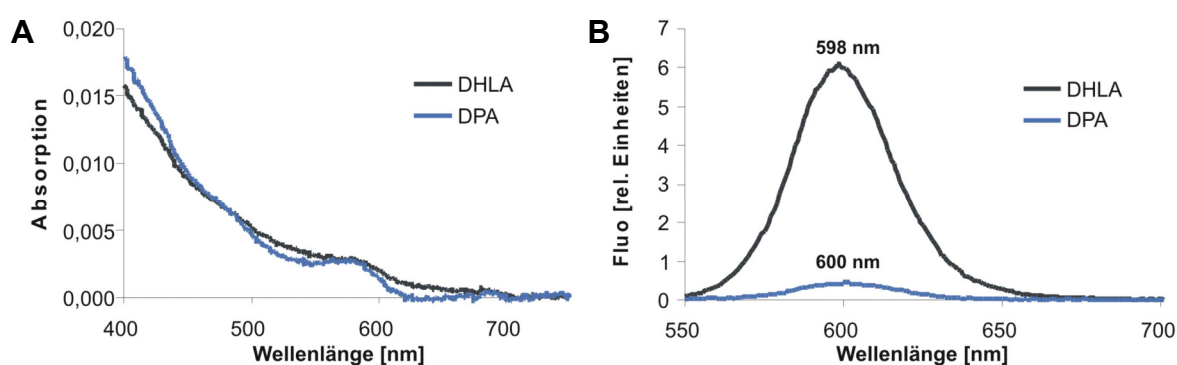


Abb. 3.4.1 Absorption und Fluoreszenz von QDs mit verschiedenen Liganden.

Absorptions- (A) und Fluoreszenzemissionsspektren (B; $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) von 6xZnS-QDs mit Liponsäure (DHLA) bzw. D-Penicillamin (DPA) als Ligand. Die Konzentration der QDs betrug jeweils 40 nM, die Verdünnungen wurden mit QD-Saccharosegradientenpuffer hergestellt.

Alle vier Varianten zeigten ein vergleichbares Absorptionsverhalten (Abb. 3.4.1 A). Im IR-Bereich absorbierten die QDs kein Licht, erst ab 650 nm war eine geringe Absorption zu beobachten. Um 580 nm ergab sich ein lokales Maximum, welches für die

Konzentrationsbestimmung genutzt wird. Anschließend stieg die Absorption bis in den UV-Bereich kontinuierlich und stetig ohne charakteristische Maxima an.

Die Fluoreszenzmaxima aller verwendeten QDs befanden sich in QD-Saccharosepuffer um 600 nm (Abb. 3.4.1 B). Bei Multishell-QDs lag es bei 595 nm (DHLLA) bzw. 620 nm (DPA), bei 6xZnS-QDs bei 598 nm (DHLLA) und 600 nm (DPA). Somit waren sie bei QDs mit DHLLA kurzwelliger als bei QDs mit DPA. Ein weiterer Unterschied zwischen den Liganden konnte bei der Quantenausbeute beobachtet werden. Während QDs mit DHLLA jeweils eine Quantenausbeute um 35% (in dH₂O) aufwiesen, konnten für DPA-QDs nur rund 10fach geringere Werte beobachtet werden. Die Natur der Liganden schien demnach größeren Einfluss auf die Emissionseigenschaften zu haben, als die Beschaffenheit der Hüllschichten.

4.2 Verhalten der QDs in wässriger Lösung

Für die Analysen eines möglichen Energietransfers zwischen QDs und LHCII ist eine stabile QD-Fluoreszenz als Referenz entscheidend. Daher wurde im Folgenden untersucht inwieweit diese reproduzierbar ist. Von mehreren parallel angesetzten, gleich konzentrierten QD-Verdünnungen wurden Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen und analysiert. Es fiel hierbei auf, dass die Spektren sich nicht wie bei analogen LHCII- oder Fluoreszenzfarbstoffproben decken. Im Gegenteil konnten deutlich Unterschiede bei parallel angesetzten QD-Proben beobachtet werden. Bei den untersuchten QDs mit DHLLA als Ligand wiesen die maximalen Intensitäten eine Standardabweichung von 10% auf (Abb. 3.4.2 A). Bei DPA-QDs lagen zwar die Spektren von einigen Proben in einem engen Bereich von 6%, es gab jedoch auch Proben deren maximale Intensitäten deutlich davon abwichen und so insgesamt zu einer Standardabweichung von 20% führten (Abb. 3.4.2 B).

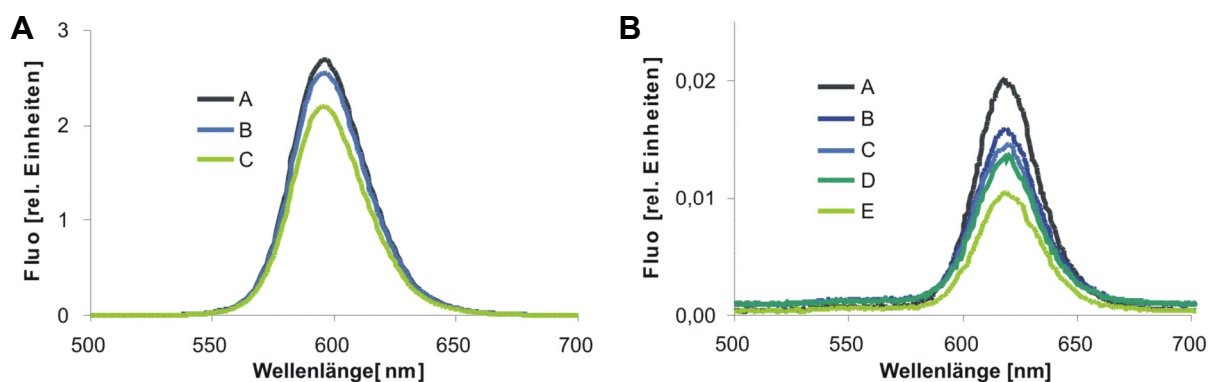


Abb. 3.4.2 Reproduzierbarkeit des Fluoreszenzverhaltens der QDs in wässriger Lösung.

Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$) von mehreren parallel angesetzten Multishell-QD-Verdünnungen in dH₂O (QD-Konzentration: 6 nM). A) QDs mit DHLLA, drei Parallelproben (A-C), B) QDs mit DPA, fünf Parallelproben (A-E). Daten im Rahmen der Staatsexamensarbeit von Patricia Eck erhoben (Eck, 2009).

Die verwendeten QDs wurden nach ihrer Synthese in reinem dH₂O bei Raumtemperatur und Dunkelheit in Konzentrationen von wenigen $\mu\text{mol/l}$ gelagert. Auch in diesen Stammlösungen konnte beobachtet werden, dass DHLA-QDs stabiler waren als DPA-QDs. In jeder der verwendeten Proben entstand nach einiger Zeit ein orange-farbener Niederschlag, der vermutlich auf aggregierte und ausfallende QDs zurückzuführen war. Während dieses Phänomen bei DPA-QDs schon nach 1-2 Wochen zu beobachten war und die QDs somit nicht mehr verwendet werden konnten, blieben DHLA-QD-Proben ungefähr einen Monat niederschlagsfrei.

Bei Versuchen mit LHCII müssen die QDs aber nicht nur in reinem dH₂O gelöst werden. Vielmehr bedarf es zur Stabilisierung des Protein-Pigment-Komplexes mehrerer Komponenten. Die Anwesenheit von Detergenz und einem Puffersystem ist obligatorisch, Saccharose wirkt zwar stabilisierend, dennoch ist sie nicht unbedingt notwendig. Es wurde daher auch untersucht, inwieweit sich die jeweiligen Substanzen auf die QD-Fluoreszenz auswirken und gleich konzentrierte QD-Verdünnungen mit den entsprechenden Substanzen angesetzt. Bei anschließend durchgeführten Fluoreszenzmessungen zeigte sich, dass die QD-Emission durch alle Zusätze im Vergleich zu einer gleich konzentrierten Probe in reinem dH₂O verringert wurde. Direkt nach der Verdünnung fiel dabei die Fluoreszenzintensität stärker ab, bevor sie sich nach ungefähr 60 min einem mehr oder weniger stabilen Wert näherte (ohne Abbildung, vgl. Eck, 2009). Die vergleichende Auswertung erfolgte daher nach einer 90-minütigen Inkubation (Abb. 3.4.3). Während das Detergenz LM den geringsten Intensitätsverlust bewirkte, wurde die Fluoreszenz durch den NaP-Puffer dramatisch verringert. Saccharose hatte sozusagen einen mittleren Effekt, die Erhöhung von 0,5 auf 0,6 M erbrachte kaum einen Unterschied.

Obwohl diese Versuche verdeutlichen, dass QDs in dem verwendeten QD-Saccharosegradientenpuffer nur bedingt stabil sind, wurde dieser im Folgenden für die Versuche mit LHCII verwendet. Vor der Analyse der Hybridkomplexe erfolgte immer eine 90-minütige Inkubation der QD-Ansätze, zusätzlich wurde die QD-Fluoreszenz versuchsbegleitend beobachtet.

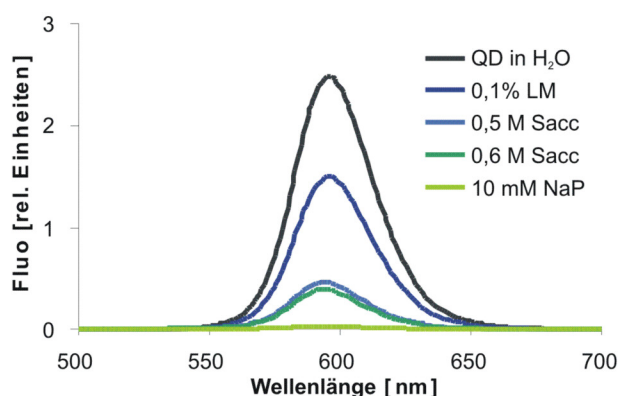
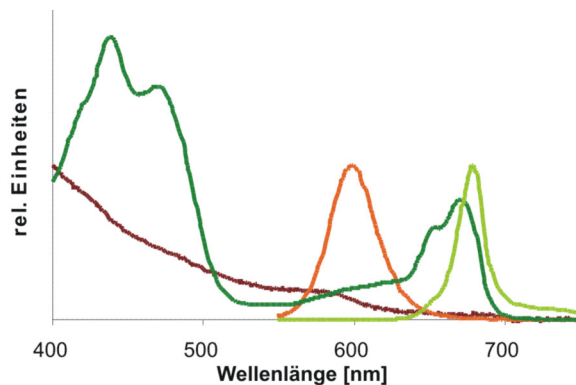


Abb. 3.4.3 Einfluss der Pufferkomponenten auf die QD-Fluoreszenz.

Fluoreszenzemissionspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$) von je 6 nM Multishell-QD-Verdünnungen. Diese befanden sich entweder in purem dH₂O (QD in H₂O) oder es wurden jeweils die Einzelkomponenten des QD-Saccharosegradientenpuffers hinzugefügt. Sacc – Saccharose. Daten im Rahmen der Staatsexamensarbeit von Patricia Eck erhoben (Eck, 2009).

5 Versuche zum Energietransfer von QD auf LHCII

Erste Versuche von Typ I Multishell-QDs und LHCII ließen auf eine Interaktion und einen möglichen Energietransfer zwischen den beiden Komponenten schließen (Boggasch, 2006, Erker et al., 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun versucht den Energietransfer zu bestätigen und näher zu charakterisieren. Neben der Ausweitung der Versuche auf LHCII-Trimere wurde dabei auch der Wechsel zu 6xZnS-QDs in den Hybridkomplexen vollzogen.



Auf Grund der spektralen Eigenschaften der QDs dienen alle verwendeten Arten als Energiedonoren für den LHCII (Abb. 3.5.1).

Abb. 3.5.1 Spektrale Überlappung von QD und LHCII.

Normierte Absorptions- und Fluoreszenzspektren von QDs (rot und orange) und LHCII (dunkelgrün und hellgrün).

5.1 Versuche mit Multishell-QDs und LHCII

Wie schon erwähnt wurden bereits erste Versuche bezüglich des Energietransfers zwischen QD und LHCII mit Multishell-QDs durchgeführt. Dabei konnte eine deutliche Löschung der QD-Fluoreszenz abhängig vom verwendeten LHCII-Klon beobachtet werden (Boggasch, 2006, Erker et al., 2009). Hier wurden nun zusätzlich LHCII-Trimere verwendet, außerdem sollte untersucht werden, ob die gelöschte Donorfluoreszenz tatsächlich auf einen Energietransfer zum LHCII zurückzuführen ist. In allen Versuchen wurden QDs mit DHLA als Ligand verwendet.

5.1.1 Titrationsversuche

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Basché wurde der Einfluss von LHCII-Trimern auf Multishell-QDs in Titrationsexperimenten untersucht. Diese wurden analog zu den vorangegangenen Versuchen mit gleichbleibender QD- und ansteigender LHCII-Konzentration durchgeführt. Dabei bezog sich letztere immer auf Monomere und somit interagierende LHCII-Untereinheiten. Allerdings wurde eine andere Multishell-QD-Charge verwendet, daher mussten für einen Vergleich aller Daten auch entsprechende LHCII-Monomere mit der neuen QD-Charge untersucht werden. Zusätzlich konnten für die LHCII-Klone $\Delta N22$ und $\Delta N22h$ keine Trimerdaten erhoben werden, da diese beiden N-terminalen Deletionsmutanten nicht trimerisieren (Hobe et al., 1995).

LHCII und QDs wurden in unterschiedlichen $[LHCII]/[QD]$ -Verhältnissen gemischt und nach 90-minütiger Inkubation Fluoreszenzemissionsspektren der Proben aufgenommen.

Hierbei konnte bei steigender LHCII-Konzentration ein Rückgang der QD-Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 3.5.2 A). Der gleichzeitig beobachtete Anstieg der LHCII-Fluoreszenz war in diesem Fall, auf Grund von fehlenden LHCII-Referenzen, allein auf die steigende LHCII-Menge in den Proben zurückzuführen. Zusätzlich Absorptionsspektren der Proben dienten zur Kontrolle und Bestätigung der eingesetzten Konzentrationen (ohne Abbildung).

Die Auswertung der Versuche erfolgte über Stern-Volmer-Diagramme. Hierbei wird die Löschung der Donorfluoreszenz in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentrationen dargestellt. Die Löschung der Donorfluoreszenz berechnet sich dabei als Quotient der QD-Fluoreszenz in Abwesenheit von LHCII (F_0) zur QD-Fluoreszenz in Anwesenheit von LHCII (F). Zu den Rohdaten wurde eine Gerade gefittet, deren Anstieg als „QD-Löschungskonstante“ bezeichnet wurde (Abb. 3.5.2 B).

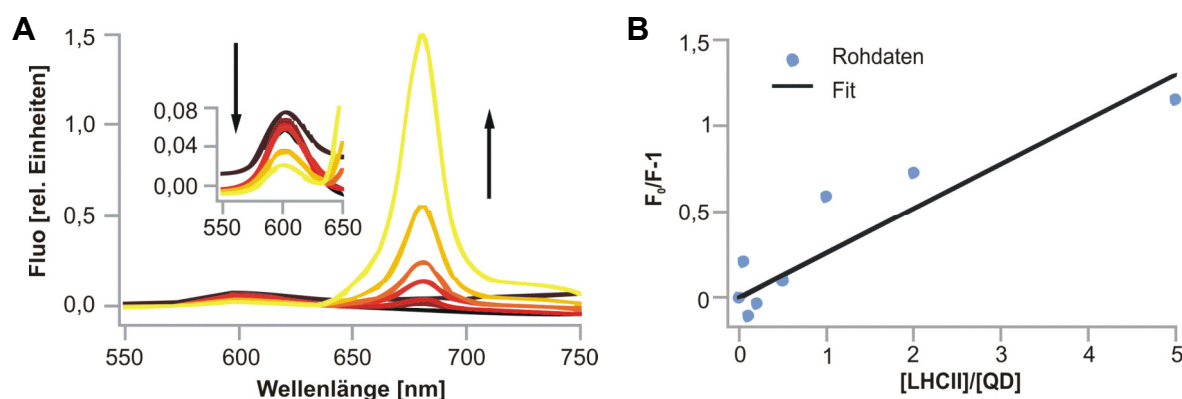


Abb. 3.5.2 Exemplarische Löschung der QD-Donorfluoreszenz und Berechnung der QD-Löschungskonstanten.

A) Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) von DHLA-Multishell-QDs in Anwesenheit von steigenden Mengen an LHCII (D7f3-Monomeren). Die QD-Konzentration betrug konstant 15 nM, die LHCII-Konzentration 0; 7,5; 15; 30 und 75 nM (schwarz über rot bis gelb). B) Stern-Volmer Diagramm der QD-Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit des molaren LHCII-QD-Verhältnisses. Die Steigung des angepassten Graphen entspricht der QD-Löschungskonstante. F_0/F – QD-Fluoreszenz in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von LHCII.

Diese QD-Löschungskonstanten unterschieden sich je nach verwendetem LHCII-Klon deutlich (Tabelle III.1). Bei vorangegangenen Versuchen von LHCII-Monomeren mit der ersten QD-Charge ergab sich für $\Delta N22$ mit 0,11 der niedrigste Wert. LHCII-Proben mit „His-Tag“ ($\Delta N22h$) bzw. mit den 22 N-terminalen Aminosäuren löschten die QD-Fluoreszenz dagegen stärker und ergaben Werte um 0,4. Die höchste QD-Löschungskonstante konnte für C3.2h (N-Terminus + „His-Tag“) berechnet werden. Bei der Verwendung der neuen QD-Charge ergaben sich für D7f3- und C3.2h-Monomere Werte, die denen der ersten Charge vergleichbar waren. Wiederum war die Löschungskonstante für D7f3 deutlich niedriger als für C3.2h. Während sie bei D7f3 mit 0,4 in etwa denselben Wert wie bei der ersten Charge annahm, lag der Wert für C3.2h bei der zweiten Charge mit 0,66 ungefähr 20% unter dem ursprünglichen.

Tabelle III.1 QD-Löschungskonstanten für unterschiedliche LHCII-Mutanten.

Die Löschungskonstanten entsprechen den Steigungen der angepassten Geraden in den entsprechenden Stern-Volmer-Diagrammen. QD1/2 – zwei unterschiedliche, nach demselben Rezept hergestellte DHLA-Multishell-QD-Chargen. Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4-7 Einzelmessungen.

LHCII-Mutante	LHCII-Oligomerisierung	Multishell-QD-Charge	
		QD1	QD2
D7f3	Monomer	0,41 ± 0,11	0,40 ± 0,04
C3.2h		0,84 ± 0,10	0,66 ± 0,07
ΔN22		0,11 ± 0,04	-
ΔN22h		0,37 ± 0,05	-
D7f3	Trimer	-	0,18 ± 0,06
C3.2h		-	0,81 ± 0,09

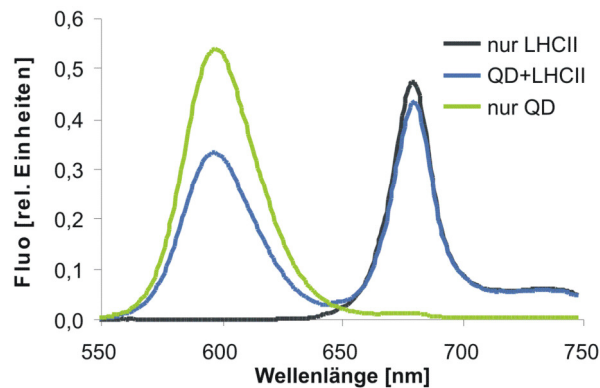
Beim Vergleich mit LHCII-Trimeren blieb die Tendenz dieselbe. Diesmal lag allerdings der Wert für C3.2h mit 0,81 auf gleicher Höhe wie bei der Verwendung von C3.2h-Monomeren und QDs der ersten Charge. Die QD-Löschungskonstante für D7f3-Trimere lag deutlich niedriger und mit 0,18 betrug sie nur noch rund 50% des entsprechenden Wertes für D7f3-Monomere.

Diese Ergebnisse zeigten somit, dass die QDs verschiedener Chargen trotz gleicher Herstellung geringfügige Unterschiede aufwiesen. Dennoch blieben die generellen Tendenzen dieselben. Auf Grund der Tatsache, dass die QD-Löschungskonstanten für LHCII-Trimere in etwa denen für Monomere entsprachen und Trimere deutlich stabiler sind, wurden im Weiteren nur noch diese verwendet.

5.1.2 Untersuchungen des Energietransfermechanismus

Die deutliche QD-Fluoreszenzlöschung in Anwesenheit von LHCII legt zwar einen Energietransfer zwischen den beiden Komponenten nahe, für die Bestätigung bedarf es allerdings auch eines Fluoreszenzzuwachses auf der Akzeptor-(LHCII)-Seite. Daher wurde im Folgenden zu jeder QD-LHCII-Probe eine entsprechend gleich konzentrierte LHCII-Referenz angesetzt und untersucht. Mit dieser Kontrolle sollte nun festgestellt werden, ob es durch die Anwesenheit von Multishell-QDs zu einem LHCII-Fluoreszenzzuwachs kommt. Die entsprechenden Versuche wurden ausführlich von Patricia Eck dargestellt (Eck, 2009), hier soll nur ein exemplarisches Beispiel gezeigt werden.

Die Fluoreszenzemissionsspektren einer Probe mit gleicher QD und LHCII-Konzentration zeigten wie schon in vorherigen Versuchen im Vergleich zu einer QD-Probe ohne LHCII einen deutlichen Verlust der Donor-(QD)-Fluoreszenz (Abb. 3.5.3). Der Vergleich der LHCII-Fluoreszenz mit einer entsprechenden Kontrolle ergab anders als erwartet keinen Zuwachs,



sondern ebenfalls einen Fluoreszenzverlust. Dieser betrug ungefähr 10% der LHCII-Fluoreszenz.

Abb. 3.5.3 Untersuchung der LHCII-Fluoreszenz in Anwesenheit von Multishell-QDs.

Exemplarische Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$) von DHLA-Multishell-QDs und S160Ch-Trimeren (LHCII) einzeln und zusammen. Konzentration beider Komponenten 6 nM. Daten im Rahmen der Staatsexamensarbeit von Patricia Eck ermittelt (Eck, 2009).

Im Rahmen dieser Experimente konnte demnach kein Nachweis für einen Energietransfer erbracht werden. Als mögliche Ursache wurde die Entfernung zwischen dem photoenergetisch aktiven QD-Kern und dem LHCII in Betracht gezogen. Diese wird maßgeblich durch die QD-Hüllschichten beeinflusst. Es wurde daher in weiteren Versuchen untersucht, ob ein Wechsel zu anderen Typ I-QDs mit dünnerer Hüllschicht einen Vorteil bringt.

5.2 Versuche mit 6xZnS-QDs und LHCII

Auf Grund der Ergebnisse mit Multishell-QDs wurden als Alternative 6xZnS-QDs für Hybridkomplexe aus Typ I-QDs und LHCII verwendet. Durch den unterschiedlichen Aufbau der QD-Hülle wurde gehofft, bei 6xZnS-QDs einen erfolgreichen Energietransfer von QD auf LHCII beobachten zu können. Hierfür wurden nicht nur QDs mit DHLA als Ligand, sondern auch welche mit DPA verwendet. Zusätzlich zu dem LHCII-Klon C3.2h wurden die QDs als Negativkontrolle auch mit unpigmentiertem WSCP, welches ebenfalls einen „His-Tag“ besitzt, versetzt.

5.2.1 Versuche mit 6xZnS-QDs mit Liponsäure

Ausgehend von den Versuchen mit Multishell-QDs galten die ersten Versuche mit 6xZnS-QDs der Untersuchung der LHCII-Fluoreszenz in Anwesenheit von QDs. Hierfür wurden DHLA-6xZnS-QDs und C3.2h-Trimere gemischt und als Kontrollen gleich konzentrierte QD- und LHCII-Referenzen hergestellt. Die Analyse der Proben erfolgte durch Fluoreszenzemissionsspektren. Hier zeigte sich, dass auch bei diesen QDs eine deutliche Löschung der QD-Fluoreszenz bei Anwesenheit von C3.2h beobachtet werden konnte (Abb. 3.5.4). Obwohl in diesen Versuchen kein deutlicher Zuwachs der LHCII-Fluoreszenz bei

680 nm zu verzeichnen war, konnte genauso wenig von einem Verlust von LHCII-Fluoreszenz gesprochen werden. Vielmehr fluoreszierten die C3.2h-Trimere in An- und Abwesenheit von QD mit gleicher Intensität.

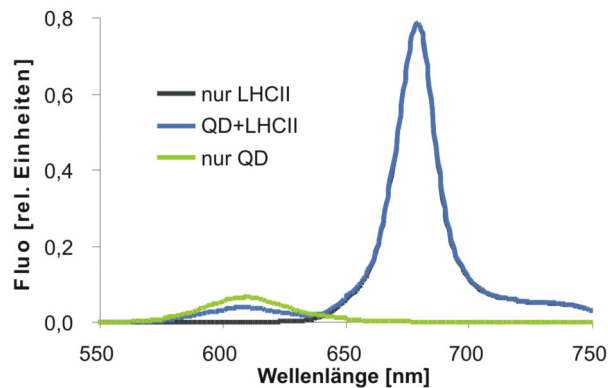


Abb. 3.5.4 Untersuchung der LHCII-Fluoreszenz in Anwesenheit von 6xZnS-QDs.

Exemplarische Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$) von DHLA-6xZnS-QDs und C3.2h-Trimern einzeln und zusammen. QD-Konzentration 15 nM, LHCII-Konzentration 30 nM. Daten im Rahmen der Staatsexamensarbeit von Constanze Häcker ermittelt (Häcker, 2009).

Dieses Ergebnis konnte zwar nicht als Beweis für einen Energietransfer angesehen werden, dennoch schienen diese QDs besser als Komponenten in QD-LHCII-Hybridkomplexen geeignet als die vorherigen Multishell-QDs. Daher wurde weiterführend untersucht, ob die beobachtete QD-Löschung analog zu Multishell-QDs von der eingesetzten LHCII-Menge abhängt. Hierfür wurden gleich konzentrierte QD-Proben in molaren [LHCII]/[QD]-Verhältnissen von 0,1 bis 20 mit C3.2h-Trimern inkubiert. Fluoreszenzemissionsspektren bestätigten, dass die Fluoreszenz dieser QDs bei ansteigender LHCII-Konzentration immer geringer wurde (Abb. 3.5.5 A). Die QD-Löschungskonstante lag hier bei 0,22.

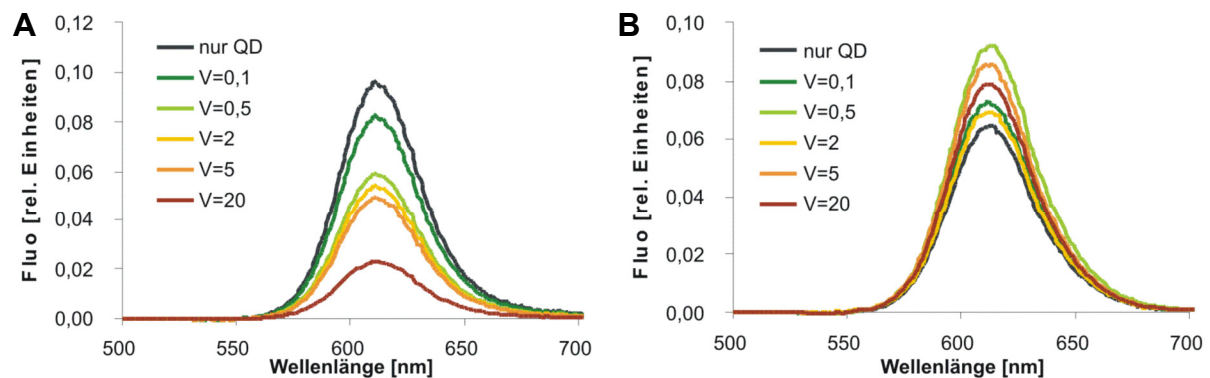


Abb. 3.5.5 Fluoreszenz von DHLA-6xZnS-QDs in Anwesenheit von „His-Tag“-Proteinen.

Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$) von 15 nM QD-Proben bei ansteigenden Protein-Mengen. Verwendete „His-Tag“-Proteine: A) C3.2h-Trimere, dargestellt sind die nach Dekonvolution erhaltenen QD-Einzelspektren, B) unipigmentiertes WSCP, dargestellt sind die Originalspektren. V – [Protein]/[QD]-Verhältnis. Daten im Rahmen der Staatsexamensarbeit von Constanze Häcker ermittelt (Häcker, 2009).

Die QD-Fluoreszenzintensität wurde also maßgeblich vom anwesenden LHCII beeinflusst. Da jedoch kein eindeutiger Akzeptor-(LHCII)-Zuwachs beobachtet werden konnte, wäre es denkbar, dass diese Löschung allein durch die Bindung eines Proteins an die QDs und damit einer veränderten QD-Oberfläche zustande kommt. Die im LHCII anwesenden Chlorophylle

hätten somit keinen Einfluss. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden DHLA-6xZnS-QDs statt mit C3.2h mit ansteigenden Mengen an unpigmentiertem WSCP, welches auch einen „His-Tag“ besitzt, gemischt und nach 90-minütiger Inkubation Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen. Hier zeigte sich, dass bei der Verwendung von WSCP keine QD-Fluoreszenzlöschung beobachtet werden konnte (Abb. 3.5.5 B). Vielmehr fluoreszierten alle QD-Proben, die mit WSCP inkubiert worden waren, mit einer geringfügig höheren Intensität als die entsprechende proteinfreie Probe. Einen Zusammenhang zwischen WSCP-Konzentration und QD-Fluoreszenzzuwachs konnte allerdings nicht gezeigt werden.

Diese Versuche zeigten, dass allein die Anwesenheit eines Proteins nicht für eine Löschung der QD-Fluoreszenz sorgt. Entscheidend scheinen dagegen die Chlorophylle als mögliche Akzeptorfarbstoffe zu sein. Dies spricht daher für einen Energietransfer zwischen den Komponenten. Weshalb trotz deutlicher Donorlöschung kein Akzeptorzuwachs zu sehen war, muss dagegen diskutiert werden.

5.2.2 Versuche mit 6xZnS-QDs mit D-Penicillamin

Als Alternative zu 6xZnS-QDs mit DHLA wurden auch QDs mit DPA als Ligand für Untersuchungen zum Energietransfer verwendet. Wie in den schon dargestellten Versuchen, wurden die QDs in verschiedenen molaren Verhältnissen mit C3.2h-Trimeren gemischt, inkubiert und Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen. Bei der Betrachtung dieser Spektren konnte zunächst nur eine Fluoreszenz bei 680 nm beobachtet werden. Diese ist den zugegebenen LHCII-Trimeren zuzuordnen. Die Fluoreszenzintensitäten waren hier bei Proben mit QDs deutlich höher als bei den entsprechenden Referenzen, die nur Protein enthielten (Abb. 3.5.6 A).

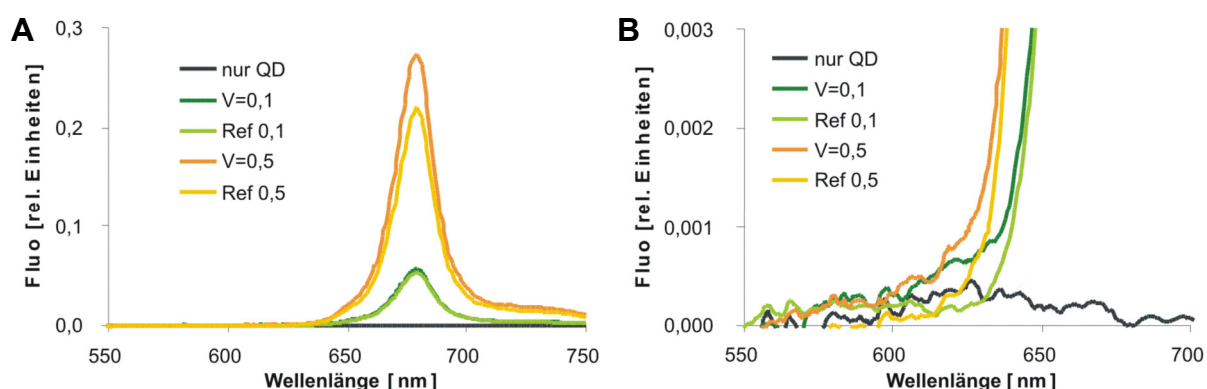


Abb. 3.5.6 Energietransfer von DPA-6xZnS-QDs auf C3.2h-Trimere.

Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$) von 15 nM QD-Proben in Anwesenheit von unterschiedlichen Mengen an LHCII. A) Gesamtspektrum, B) 100fach vergrößerter Ausschnitt von (A) zur Verdeutlichung der QD-Fluoreszenz. V – [LHCII]/[QD]-Verhältnis, Ref – entsprechende, gleich konzentrierte LHCII-Referenz. Daten im Rahmen der Staatsexamensarbeit von Constanze Häcker ermittelt (Häcker, 2009).

Erst bei genauer Betrachtung des Bereiches um 600 nm konnte eine QD-Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 3.5.6 B). In der QD-Referenz war diese jedoch ungefähr 600mal schwächer als die Fluoreszenz einer gleich konzentrierten LHCII-Probe. Auf Grund dieses Unterschiedes war auf Seiten der QD-Fluoreszenz keine eindeutige Aussage über eine mögliche Fluoreszenzlöschung zu treffen. Es machte zwar den Anschein, als ob mit steigender C3.2h-Konzentration weniger QD-Fluoreszenz zu verzeichnen sei, allerdings befand sich diese mehr oder weniger im Rauschen. Durch Dekonvolution erhaltene QD-Einzelspektren konnten daher nicht herangezogen werden.

Wie schon bei DHLA-6xZnS-QDs wurden auch 6xZnS-QDs mit DPA als Kontrolle mit unpigmentiertem WSCP inkubiert und anschließend Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen. Analog zu den Ergebnissen mit DHLA-QDs fluoreszierten die QDs bei Anwesenheit von WSCP deutlich stärker als in der QD-Referenz (Abb. 3.5.7).

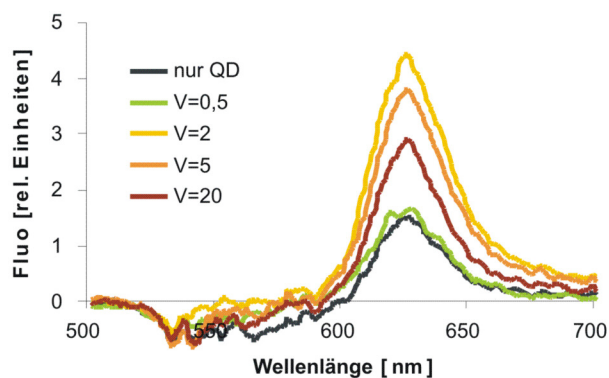


Abb. 3.5.7 Fluoreszenz von DPA-6xZnS-QD in Anwesenheit von unpigmentiertem WSCP.

Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$) von 15 nM QD-Proben bei ansteigenden Mengen an unpigmentiertem WSCP. V – [WSCP]/[QD]-Verhältnis. Daten im Rahmen der Staatsexamensarbeit von Constanze Häcker ermittelt (Häcker, 2009).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die deutlich geringere Quantenausbeute von 6xZnS-QDs mit DPA im Vergleich zu entsprechenden QDs mit DHLA (vgl. III.4.1) bei diesen Versuchen als Hindernis für genaue Analysen des Energietransfers erwies. Dennoch schienen trotz eines anderen Liganden dieselben Tendenzen vorhanden zu sein. Bei den Untersuchungen mit C3.2h ist eine Löschung der QD-Fluoreszenz denkbar, die LHCII-Fluoreszenz war dagegen eher stabil. Bei der Inkubation mit unpigmentiertem WSCP konnte dagegen ein Zuwachs der QD-Fluoreszenz beobachtet werden.

6 Versuche zur Bindung von LHCII an QD

Die Versuche zum Energietransfer zwischen QDs und LHCII gehen immer von einer Interaktion der beiden Komponenten aus. Dies scheint auch auf Grund der beobachteten Änderungen im Fluoreszenzverhalten beider Stoffe gegeben, dennoch ist dies aber nur ein indirekter Nachweis einer Bindung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Methode entwickelt die Bindung von LHCII an QDs durch Trennung des Addukts von ungebundenem LHCII in einer Dichtegradienten-Zentrifugation direkt zu zeigen und analysieren zu können. Auf diesem Wege sollte unter anderem die Frage geklärt werden, ob der LHCII bei einer Bindung an die QDs intakt bleibt. Neben den bisherigen LHCII-Mutanten wurden dabei auch neue Klone untersucht, die als Fusionsproteine aus LHCII und ZnS-bindenden Peptiden entstanden waren.

6.1 Herstellung der ZnS-Bindungsmutanten

Viele Peptide besitzen zu spezifischen Partnern hohe Bindungsaffinitäten. Diese Partner können nicht nur andere Peptide/Proteine oder sonstige organische Verbindungen, sondern auch anorganische Oberflächen sein, wobei potentielle Affinitäten durch „Phage-Display“-Analysen ermittelt werden können. Auf diese Weise wurden auch Peptide gefunden, die hohe Affinitäten zu ZnS besitzen (Lee et al., 2002; Flynn et al., 2003). Die zwei Sequenzen unten denen in dieser Veröffentlichung gezeigt, die am stärksten mit ZnS interagierten, wurden im Rahmen dieser Arbeit durch Insertionen auf DNA-Ebene N- oder C-terminal an die LHCII-Sequenz angefügt und die erhaltenen Klone sowohl auf ihre korrekte Faltung als auch auf ihre Bindung zu QDs mit ZnS-Hüllen getestet.

6.1.1 Klonierungsstrategie und Mutagenese der ZnS-Bindungsmutanten

Die Sequenz, die am effektivsten an ZnS bindet (A7), besitzt zwei Cysteine, und kann somit eine Disulfidbindung ausbilden. Dabei entsteht eine Schleife, welche für eine positive ZnS-Bindung entscheidend ist (Flynn et al., 2003). Im Voraus konnte nicht eindeutig gesagt werden, ob sich diese Struktur negativ auf die Faltung des LHCII auswirken könnte, daher wurde außerdem die Z8-Sequenz, und damit die Sequenz mit der zweithöchsten ZnS-Affinität, als Fusionspeptid verwendet.

In den „Phage-Display“-Analysen von Flynn et al. (2003) befanden sich die ZnS-bindenden Peptide N-terminal an Hüllproteinen der Phagen. Analog sollten die Sequenzen A7 und Z8 auch für die LHCII-Fusionproteine N-terminal angefügt werden. Als Alternative wurde die Z8-Sequenz C-terminal angefügt, um mögliche Faltungs- und/oder

Bindungsunterschiede untersuchen zu können. Die entstandenen Klone erhielten die Namen A7-N, Z8-N und Z8-C (Tabelle III.2).

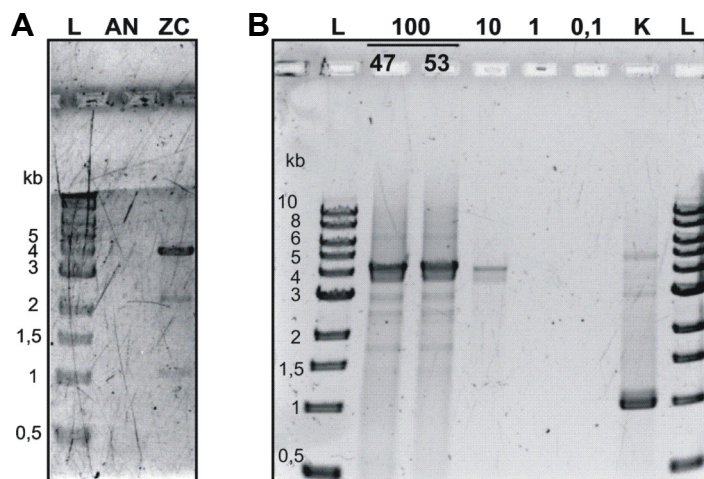
Tabelle III.2 Sequenzen der ZnS-Bindungsmutanten

Als LHCII-Ausgangsklon diente jeweils C79S, als Linker zwischen LHCII-Sequenz und ZnS-Bindungssequenz wurden die Aminosäuren GGS analog zu Flynn et al. (2003) eingeführt.

LHCII-Mutante	Ort des Inserts	Sequenz
A7-N	N-terminal	A7: CNNPMHGNC
Z8-N	N-terminal	Z8: LRRSSEAHNSIV
Z8-C	C-terminal	Z8: LRRSSEAHNSIV

Als Ausgangsklon für die Fusionsproteine wurde C79S verwendet. Die Abwesenheit eines „His-Tags“ erschwert zwar die Trimerisierung des LHCII, ist aber für die Eindeutigkeit der Interaktion zwischen Protein und QD wichtig. Um die Möglichkeit zu haben, später gezielte Cysteine für Farbstoffmarkierungen einfügen zu können, wurde eine Cystein-freie LHCII-Mutante gewählt. Die Klonierung erfolgte durch eine Mutagenese-PCR bei der das Insert durch 5'-überhängende Primer jeweils zur Hälfte terminal an das PCR-Produkt angehängt wurde (vgl. II.5.4.2). Um eine effiziente Proteinexpression sicherzustellen, wurden für die ZnS-Bindungssequenzen nur Tripletts verwendet, die in *E.coli* häufig vorkommen.

Die Mutagenese von Z8-C wurde mit dem „Phusion Mutagenesis Kit“ (Finnzymes) durchgeführt. Bei der Verwendung von 150 pg Ausgangs-DNA und einem sogenannten „Hotstart“ (vgl. II.5.4.2.1) erhielt man das gewünschte PCR-Produkt in ausreichender Menge (Abb. 3.6.1 A). Die anschließende Ligation und Transformation in JM101 ergab 30 Kolonien, von denen drei durch eine Plasmidisolierung und Sequenzierung genauer untersucht wurden. Die Sequenzierung zeigte, dass nur einer der Klone die gewünschte DNA-Sequenz enthielt. Die beiden anderen Klone wiesen dagegen im Insert entweder eine Deletion von sieben Nukleotiden oder die Insertion eines Guanidins auf.



PCR mit den Sequenzierungsprimern DS23+ und DS178- und 100 ng Template, L – DNA-Standard (1 kb-Ladder).

Abb. 3.6.1 Mutagenese-PCR für die Herstellung der ZnS-Bindungsmutanten.

EtBr-Färbung verschiedener PCR-Produkte nach Gelelektrophorese in Agarosegelen. A) PCR-Produkte nach der Verwendung des „Phusion Mutagenesis Kits“ mit 150 pg Template und „Hotstart“, AN – mit A7-N Primern, ZC – mit Z8-N Primern, B) PCR-Produkte nach der Verwendung des „GC-rich Kits“ mit A7-N Primern, 100/10/1/0,1 – 100; 10; 1; 0,1 ng Template, 47/53 – Annealingtemperatur 47 bzw. 53°C, K – Kontroll-

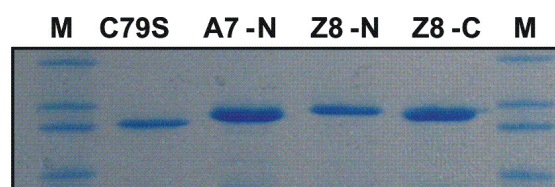
Dasselbe Protokoll führte bei den N-terminalen Fusionsproteinen nicht zu einem PCR-Produkt (Abb. 3.6.1 A), weshalb für diese Klone das „GC-rich PCR System“ (Roche) verwendet wurde. Auch hier konnte zuerst kein PCR-Produkt erhalten werden. Erst die Verwendung der 1000fachen Menge an Ausgangs-DNA ergab in Agarosegelen ein Signal auf Höhe des gewünschten Produktes bei ca. 4,3 kb, wobei dieses mit der Ausgangs-DNA eine Doppelbande bildete (Abb. 3.6.1 B). Schon eine 10fache Verringerung der DNA führte zu keinem Signal auf Höhe des Produktes. Es konnte hier nur noch die Plasmid-DNA detektiert werden. Um im Folgenden eine saubere Probe zu erhalten, musste daher die Ausgangs-DNA durch DpnI-Verdau entfernt werden. Desweiteren wurde mit der Phusion-Polymerase ein sogenannter „Proof-Reading“-Schritt durchgeführt, um Adenin-Überhänge zu entfernen, die durch die im „GC-rich“-Kit befindliche Taq-DNA-Polymerase produziert worden waren. Die anschließende Ligation und Transformation in JM101 erbrachte jeweils fünf Kolonien. Die Plasmidisolation und Sequenzierung von je drei Kolonien zeigte analog zu Z8-C nur in jeweils einer der untersuchten Proben die gewünschte codierende Sequenz. Die anderen Kolonien enthielten dagegen die Ausgangs-DNA, wobei interessanterweise in einer Z8-N-Probe zusätzlich ein „His-Tag“ codiert wurde. Die Sequenz des richtigen A7-N Klons zeigte zudem ein Nukleotidaustausch in der EcoRI-Schnittstelle 5' vor der codierenden Sequenz. Diese Mutation wurde durch einen entsprechenden Restriktionsverdau bestätigt, stellte aber für die weitere Verwendung des Klons keinen Nachteil dar.

6.1.2 Überexpression und Rekonstitution der ZnS-Bindungsmutanten

Nach der erfolgreichen Herstellung der ZnS-Bindungsmutanten mussten die Proteine nun überexprimiert und ihre Fähigkeit, sich in Anwesenheit von Pigmenten zu falten, untersucht werden. Die Überexpression erfolgte nach dem Standardprotokoll und ergab bei allen drei Mutanten normale Proteinmengen. Ein Vergleich der Proteingrößen wurde durch SDS-PAGE durchgeführt. Hier zeigte sich trotz geringer Unterschiede in der aufgetragenen Proteinmenge, dass die ZnS-Bindungsmutanten wie erwartet auf Grund ihrer zusätzlichen Aminosäuren größere apparente Molekulargewichte aufwiesen (Abb. 3.6.2). Die beiden Z8-Klone sind 15 Aminosäuren länger als der Ausgangsklon C79S und sie laufen daher geringfügig höher als A7-N mit 12 zusätzlichen Aminosäuren.

Abb. 3.6.2 Vergleich der IB-Präparationen von ZnS-Bindungsmutanten und C79S.

Coomassiefärbung der IB-Präparationen der LHCII-Klone C79S, A7-N, Z8-N und Z8-C nach SDS-PAGE, M – Marker.



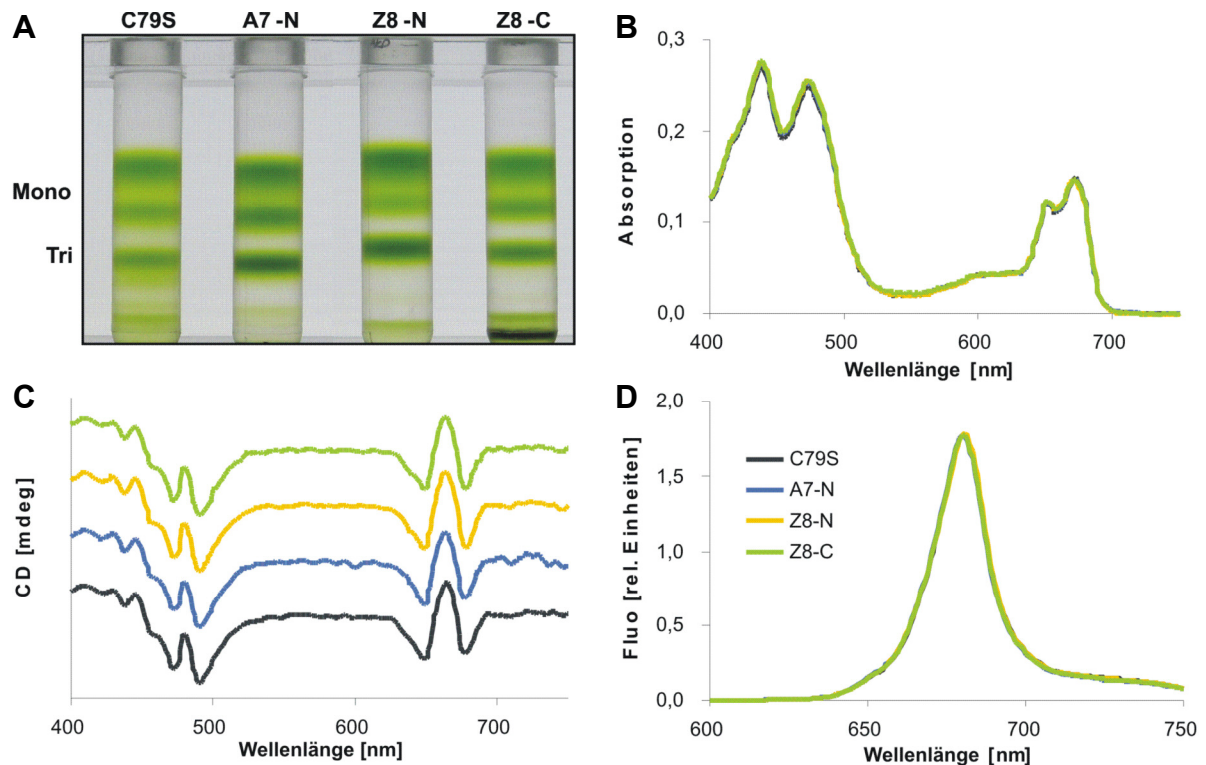


Abb. 3.6.3 Rekonstitution der ZnS-Bindungsmutanten.

Die drei ZnS-Bindungsmutanten wurden mit der Detergenz-Wechsel-Methode rekonstituiert und anschließend in Liposomen trimerisiert. Die erhaltenen Komplexe wurden mit analog hergestellten C79S-Trimeren verglichen. A) UZ-Auftrennung der Komplexe, Mono – Monomere, Tri – Trimere, B) Absorptionsspektren der trimeren Komplexe, normiert bei 670 nm, C) CD-Spektren normiert bei 492 nm und zu besserer Übersicht gestaffelt dargestellt, D) Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) der Proben, normiert bei 680 nm, Versuchsdurchführung: Alisandra Denton.

Die Analyse der Proteinfaltung erfolgte anhand von trimeren Pigment-Protein-Komplexen. Um diese zu erhalten, wurden die ZnS-Bindungsmutanten nach normaler Detergenz-Wechsel-Rekonstitution in Liposomen inseriert. Die anschließende Auftrennung der erhaltenen Komplexe in Saccharose-Dichtegradienten ergab vergleichbare Proteinbanden zum Ausgangsklon C79S (Abb. 3.6.3 A). Auch die spektralen Untersuchungen der Trimere zeigten keine Unterschiede (Abb. 3.6.3 B-C). Durch die Absorptionsspektren konnte von einer annähernd gleichen Pigmentbindung ausgegangen werden, wobei die richtige Orientierung der Pigmente und somit die richtige Proteinfaltung durch CD-Spektren bestätigt wurde. Diese führte des Weiteren zu einem funktionierenden komplexinternen Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a*, wie die Abwesenheit einer Chl *b*-Fluoreszenz um 660 nm in Fluoreszenzemissionsspektren bestätigte.

Die neuen LHCII-Klone zeigten somit trotz ihrer verlängerten Aminosäuresequenzen eine dem nativen Protein vergleichbare Faltung und Pigmentbindung und sie konnten im Weiteren auf ihre ZnS- bzw. QD-Bindungseigenschaften untersucht werden.

6.2 QD-LHCII-Bindungsexperimente

Das unterschiedliche Gewicht und die unterschiedliche Dichte von QDs und LHCII ließ die Überlegung aufkommen, dass sich diese beiden Komponenten möglicherweise durch Dichtegradienten-Zentrifugation voneinander trennen lassen. Hierfür wurde zunächst eine Auftrennung durch Ultrazentrifugation optimiert. Anschließend konnten dann verschiedene Fragen zur Bindung von QDs und LHCII beantwortet werden. Neben der grundsätzlichen Bestätigung der Bindung beider Komponenten standen die Fragen nach der Intaktheit des gebundenen LHCII und die unterschiedliche Bindung von verschiedenen LHCII-Klonen im Vordergrund.

6.2.1 Optimierung der Auftrennung durch Ultrazentrifugation

Aufgrund der geringen Mengen wurde die Dichtegradienten-Zentrifugation für die Auftrennung von QD-LHCII-Proben mit der Airfuge durchgeführt. Das für den verwendeten Rotor maximal einzusetzende Volumen beträgt hier 180 μl . Dadurch sind die Weglängen innerhalb des Röhrchens sehr gering und eine Verwendung von Saccharosegradienten analog zu der Auftrennung von LHCII-Monomeren bzw. – Trimere war nicht möglich. Stattdessen wurden Saccharosekissen verwendet, die jeweils direkt vor der Zentrifugation hergestellt wurden. Als Testlauf wurde zunächst geprüft, wie sich der LHCII während einer solchen Zentrifugation verhält. Hierfür wurden aufgetrennte C3.2h-Monomere bzw. –Trimere auf ein 1 M-Saccharosekissen gegeben und die Proben für 30 min in der Airfuge zentrifugiert. Anschließend zeigte sich, dass weder Mono- noch Trimere in der Lage waren weit in das Saccharosekissen zu migrieren (Abb. 3.6.4). Zur weiteren Analyse wurden jeweils 30 μl von ganz oben bzw. ganz unten im Röhrchen abgezogen und auf 500 μl aufgefüllt. Von den so vorbereiteten Proben konnten nun Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen werden. Hier bei zeigte sich, dass keine LHCII-Fluoreszenz in der unteren Probe detektiert werden konnte und somit tatsächlich keine LHCII-Komplexe bis in die untersten Schichten des Kissens gewandert waren.

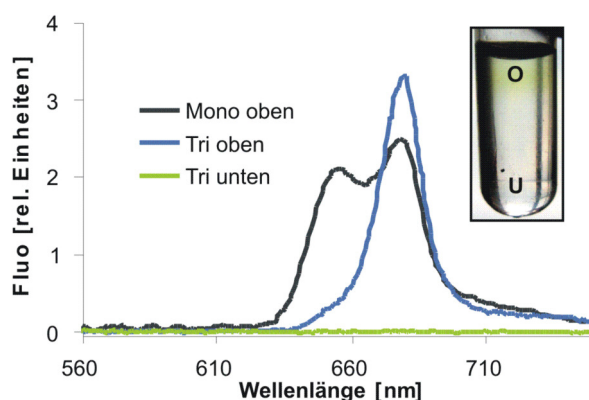


Abb. 3.6.4 Verhalten von LHCII bei der Auftrennung mit der Airfuge.

C3.2h-Mono- bzw. –Trimere (je 1,5 pmol in 30 μl QD-Saccharosegradientenpuffer) wurden auf 150 μl Airfugepuffer mit 1 M Saccharose gegeben und für 30 min bei ~ 105.000 Upm in der Airfuge zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden je 30 μl vom oberen (o) bzw. unteren (u) Teil des Röhrchens entnommen, auf 500 μl mit QD-Saccharosegradientenpuffer verdünnt und Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) aufgenommen.

Die jeweils oberen Proben ergaben dagegen ein deutliches LHCII-Signal. Während die Trimere nur ein einziges Maximum bei 680 nm aufwiesen, somit der komplexinterne Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a* nicht gestört und die Komplexe noch intakt waren, konnte bei den Monomeren ein deutliches Signal bei 660 nm (= Chl *b*-Fluoreszenz) beobachtet werden. Diese schienen demnach auf Grund der fehlenden Möglichkeit, die Airfuge zu kühlen, während der Zentrifugation zerstört zu werden. Aus diesem Grund wurden im Folgenden nur noch LHCII-Trimere für die Auftrennung mit der Airfuge verwendet.

Im Weiteren wurden nun C3.2h-Trimere mit DHLA-Mulitshell-QDs gemischt und anhand dieser Proben die Auftrennung in der Airfuge bezüglich der Zusammensetzung des Saccharosekissens, der Zentrifugierdauer und des Abziehens der Proben nach dem Lauf optimiert. Die beste Auftrennung wurde mit folgenden Parametern erzielt: Das Saccharosekissen bestand aus 50 μ l 2 M Saccharose auf die 100 μ l 1 M Saccharose gegeben wurde, die Proben wurden für 20 min zentrifugiert und bei dem Abziehen der Probe erwies sich ein Vorgehen von oben nach unten als sinnvoll, da auf diese Weise eine Verschleppung von ungebundenem LHCII in die unteren Schichte weitgehend vermieden werden konnte. Zusätzlich konnte auf diese Weise mit der unteren Probe noch mal das gesamte Röhrchen ausgespült werden und somit möglicherweise nicht sichtbare QD-Aggregate mit abgezogen werden.

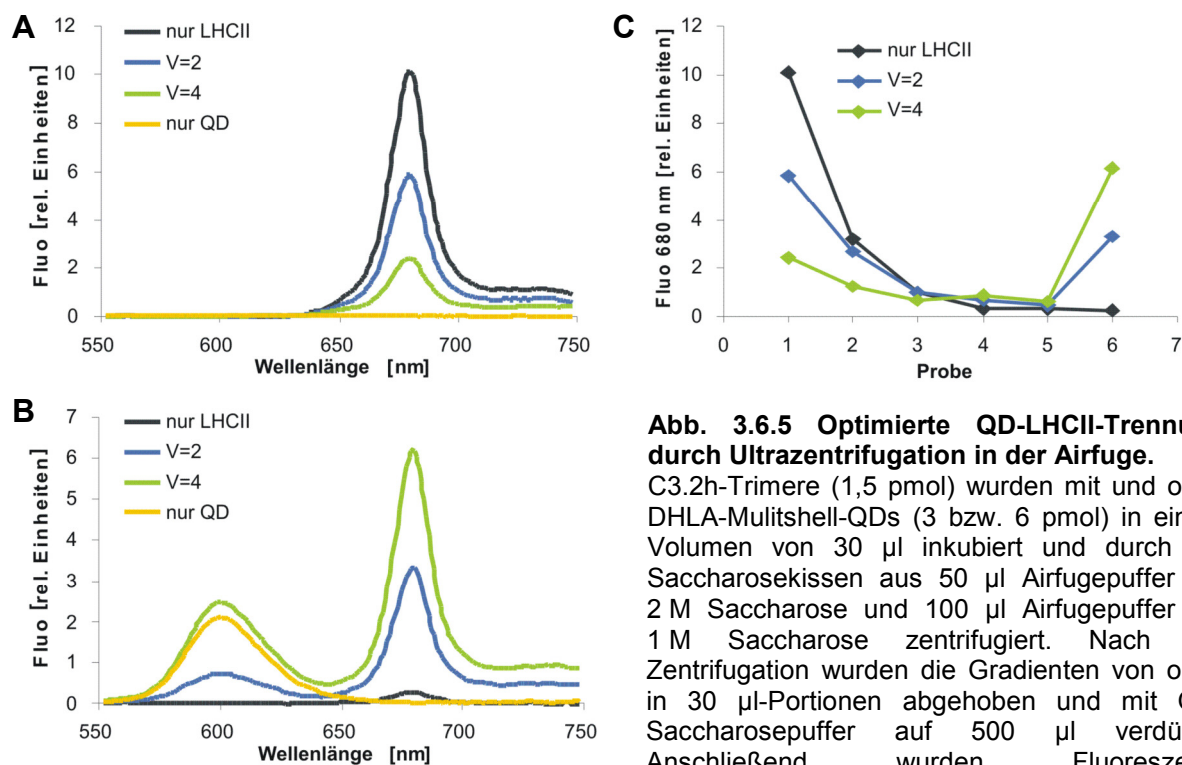


Abb. 3.6.5 Optimierte QD-LHCII-Trennung durch Ultrazentrifugation in der Airfuge.

C3.2h-Trimere (1,5 pmol) wurden mit und ohne DHLA-Mulitshell-QDs (3 bzw. 6 pmol) in einem Volumen von 30 μ l inkubiert und durch ein Saccharosekissen aus 50 μ l Airfugepuffer mit 2 M Saccharose und 100 μ l Airfugepuffer mit 1 M Saccharose zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Gradienten von oben in 30 μ l-Portionen abgehoben und mit QD-Saccharosepuffer auf 500 μ l verdünnt. Anschließend wurden Fluoreszenz-emissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) aufgenommen. Als Kontrolle dienen 6 pmol gleichbehandelte QDs. A) Fluoreszenzspektren der obersten, B) der untersten Proben, C) LHCII-Fluoreszenz bei 680 nm aller Proben gegen die Lage im Röhrchen aufgetragen, 1 = oberste Probe bis 6 = unterste Probe. V – [QD]/[LHCII]-Verhältnis.

Durch Fluoreszenzmessungen der Proben nach einer auf diese Weise durchgeführten standardmässigen Ultrazentrifugation konnten freie bzw. gemischte C3.2h- und QD-Ansätze charakterisiert werden. Die Fluoreszenzemissionsspektren aller oberen Proben wiesen nur bei 680 nm ein Maximum auf (Abb. 3.6.5 A). Ein Signal bei 600 nm, der Wellenlänge des QD-Emissionsmaximums, konnte dagegen nur in der untersten Probe, von Ansätzen die QD enthielten, detektiert werden (Abb. 3.6.5 B). Somit befanden sich LHCII und QD nach der Zentrifugation tatsächlich in verschiedenen Bereichen des Saccharosekissens. Die Ansätze, in denen vor der Zentrifugation QDs und LHCII miteinander gemischt worden waren, wiesen bezüglich der LHCII-Fluoreszenz ein von der QD-freien Probe unterschiedliches Bild auf. Bei gleichbleibender LHCII- aber ansteigender QD-Konzentration konnte in den oberen Proben ein deutlicher Rückgang der Fluoreszenz bei 680 nm beobachtet werden. In den unteren Proben war dagegen ein gegesätzliches Bild zu verzeichnen. Hier befand sich mit zunehmender QD-Menge auch mehr LHCII. Die QD-Fluoreszenz konnte dagegen unabhängig von der An- oder Abwesenheit von LHCII nur in der unteren Probe detektiert werden. Die Intensität gleich konzentrierter Proben änderten sich hier nur geringfügig.

Die Verteilung des LHCII innerhalb des Saccharosekissen konnte durch die Intensität des 680 nm-Fluoreszenzsignals nachvollzogen werden (Abb. 3.6.5 C). Hier zeigte sich, dass in allen Proben ausgehend von einem deutlichen Signal in den obersten 30 µl nur noch geringfügige Mengen an LHCII in der Mitte des Kissens detektiert werden konnten. Erst in der untersten Probe konnte wieder LHCII nachgewiesen werden. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass diese Komplexe nicht durch die QD-Anwesenheit in das Saccharosekissen verschleppt wurden, sondern fest an diese gebunden waren und somit durch deren größere Dichte in den unteren Bereich des Saccharosekissen geführt wurden.

Mit der Airfuge konnte somit eine aussagekräftige Trennung von freien und QD-gebundenen LHCII-Trimeren erzielt werden. Die dadurch erhaltenen Ergebnisse machten deutlich, dass zum einen beide Komponenten tatsächlich miteinander interagieren und zum anderen QD-gebundene LHCII intakt waren.

6.2.2 QD-Bindung unterschiedlicher LHCII-Mutanten

Durch die Möglichkeit QD-LHCII-Proben durch Ultrazentrifugation aufzutrennen, konnten nun die Bindungseigenschaften unterschiedlicher LHCII-Mutanten getestet werden. Auf Grund der Tatsache, dass in dieser Arbeit zwei verschiedene QD-Liganden eingesetzt wurden und davon ausgegangen werden kann, dass diese durch ihrer Lage an der QD-Oberfläche einen Einfluss auf die LHCII-Bindung haben, sollten hier zusätzlich die Bindungseigenschaften bei verschiedenen Liganden untersucht werden.

Für die genaue Bestimmung der gebundenen LHCII-Menge ist eine Analyse durch Absorptionsmessungen von Vorteil. Die bisher eingesetzten LHCII-Mengen waren hierfür allerdings nicht ausreichend. Daher wurden sie für die weiterführenden Versuche auf 20 pmol erhöht, wobei dies immer noch am unteren Rand der Detektierbarkeit lag. Entsprechend mussten natürlich auch die QD-Mengen erhöht werden. Testläufe mit diesen Bedingungen zeigten, dass die Auftrennung hierdurch nicht verschlechtert wurde. Allerdings pelletierten die QDs nun deutlich sichtbar während der Zentrifugation. Dies war jedoch nicht unbedingt von Nachteil. Zwar konnten nun keine zweifelsfreien Aussagen über die QDs bzw. die gebundenen LHCII getroffen werden, jedoch erleichterte dies die Analyse und Bestimmung der ungebundenen LHCII. Diese konnten komplett als Überstand von den QD-Pellets abgehoben und als eine Gesamtprobe analysiert werden.

Die Untersuchung der QD-Bindung unterschiedlicher LHCII-Mutanten erfolgte jeweils durch parallel durchgeführte Auftrennungen unterschiedlicher Proben bei gleichem [QD]/[LHCII]-Verhältnis unter der Verwendung von 6xZnS-QDs. Allerdings unterschied sich dieses Verhältnis unabsichtlich bei den beiden QD-Arten. Während es bei DHLA-QDs 2 betrug, wurden DPA-QDs in einem Verhältnis von 1 eingesetzt. Davon ausgehend ist es nachvollziehbar, dass bei der Verwendung von DHLA-QDs weniger freier LHCII in den Überständen detektiert werden konnte (Abb. 3.6.6). Allerdings konnte noch ein anderer Unterschied beobachtet werden. Während die ungebundenen LHCII nach Inkubation mit DPA-QDs einwandfreie Fluoreszenzemissionsspektren mit einem einzigen Maximum bei 680 nm aufwiesen, war bei analogen Proben nach Inkubation mit DHLA-QDs ein deutliches Signal bei 660 nm zu beobachten. Hier schienen die LHCII-Proben demnach nicht mehr intakt zu sein. Die dazugehörigen gebundenen LHCII-Trimere zeigten dagegen kein Verhalten, dass auf eine Zerstörung der Komplexe hinwies.

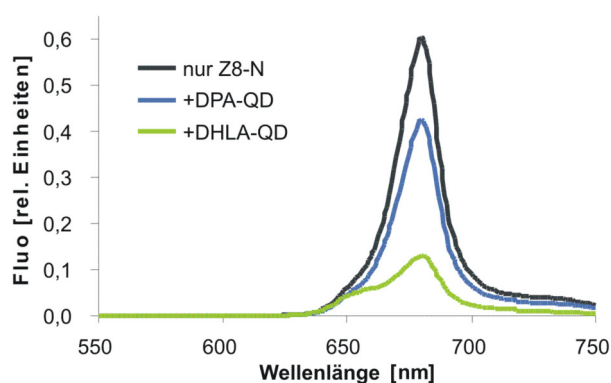


Abb. 3.6.6 Bindung von Z8-N-Trimeren an unterschiedliche 6xZnS-QDs.

Gleiche Mengen Z8-N-Trimere wurden mit 6xZnS-QDs inkubiert. Die QDs besaßen entweder DPA oder DHLA als Ligand. DPA-QDs wurden in äquimolaren zum LHCII eingesetzt, DHLA-QDs in einem [QD]/[LHCII]-Verhältnis von 2. Als Kontrolle diente eine LHCII-Probe ohne QDs. Nach der Auftrennung durch Dichtegradienten-Zentrifugation mit der Airfuge wurden die QD-freien Überstände abgehoben und mit QD-Saccharosegradientenpuffer auf 500 µl aufgefüllt. Dargestellt sind die Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) der Proben.

Anhand von Absorptionsspektren konnten die Mengen an ungebundenen LHCII-Trimeren in den Überständen nach der Auftrennung berechnet werden. Im Umkehrschluss ergab sich

daraus die Menge an gebundenem LHCII. Diese unterschied sich in Abhängigkeit des LHCII-Klons und der QD-Art (Abb. 3.6.7). Bei DPA-QDs interagierten zwischen 14 und 30% der eingesetzten LHCII-Trimere, womit die Unterschiede zwischen den Klonen rund 55% betrugen. Die geringste Bindung wurde bei D7f3-Trimeren beobachtet. Diesen folgten C3.2h-Trimere. Am stärksten interagierten A7-N und Z8-N, wobei bei letzteren noch einen Zuwachs von 10% zu verzeichnen war. Diese Tendenzen konnten schon bei der Betrachtung der Airfuge-Röhrchen nach der Zentrifugation beobachtet werden. Hier nahm die grüne Färbung im oberen Bereich des Saccharosekissens von D7f3 über C3.2h und A7-N zu Z8-N ab, wohingegen das QD-Pellet eine immer bräunlich-grünere Färbung annahm. Bei der Verwendung von DHLA-QDs waren die Unterschiede zwischen den Klonen dagegen weniger ausgeprägt und lagen mit Werten von 55-72% in einem Bereich von nur 25%. Auch hier interagierte von den vorher untersuchten LHCII-Klonen D7f3 am schlechtesten, diesem folgten allerdings A7-N und Z8-N. Der höchste Prozentsatz an gebundenem LHCII konnte für C3.2h beobachtet werden. Zusätzlich wurde bei diesen QDs auch Z8-C auf seine Fähigkeit an QDs zu binden untersucht. Dieser LHCII-Klon interagierte allerdings noch schlechter als D7f3.

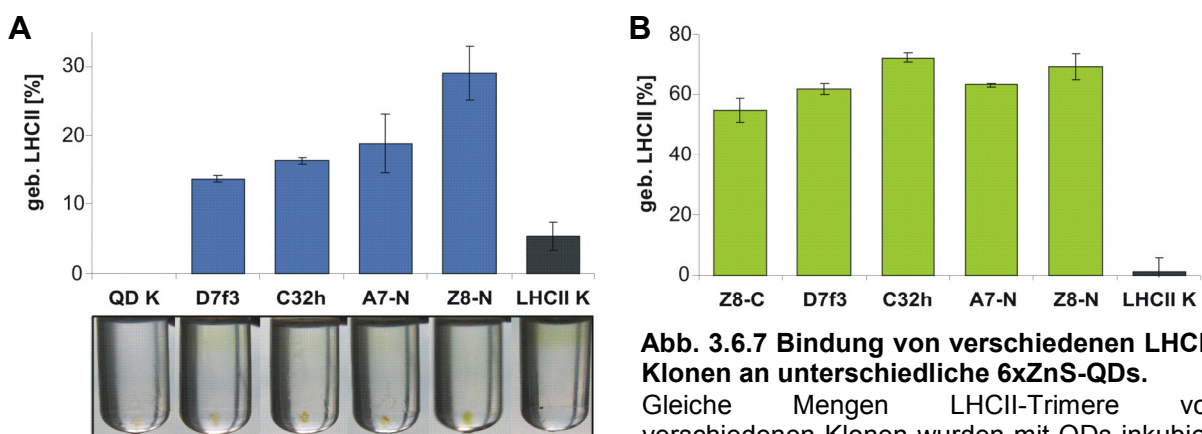


Abb. 3.6.7 Bindung von verschiedenen LHCII-Klonen an unterschiedliche 6xZnS-QDs.

Gleiche Mengen LHCII-Trimere von verschiedenen Klonen wurden mit QDs inkubiert und über Dichtegradienten-Zentrifugation mit der Airfuge aufgetrennt. Anhand der Absorptionsspektren der jeweiligen Überstände nach der Auftrennung wurden die Mengen an gebundenem LHCII berechnet. Als Kontrollen (K) dienten jeweils gleichbehandelte Proben nur mit QD bzw. LHCII. A) Bindung an DPA-6xZnS-QDs, [QD]/[LHCII]-Verhältnis = 1, B) Bindung an DHLA-6xZnS-QDs, [QD]/[LHCII]-Verhältnis = 2.

Anhand dieser Ergebnisse konnte demnach für alle verwendeten QD-LHCII-Paare eine Interaktion gezeigt werden. Das Ausmaß der Bindung hing dabei entscheidend von den verwendeten LHCII-Mutanten bzw. QD-Arten ab.

Aufgrund der Tatsache, dass die A7-Sequenz zwei Cysteine enthält, die für eine optimale Interaktion mit ZnS eine Disulfidbrücke ausbilden müssen (Flynn et al., 2003, vgl. III.6.1.1), wurde hier auch der Einfluss von Reduktionsmittel auf die QD-LHCII-Bindung getestet. Dabei wurde analog zu den vorangegangenen Versuchen vorgegangen, jedoch einer zusätzlichen

Probe 2 mM DTT zugegeben. Die Analyse der Fluoreszenzemissionsspektren nach der Auftrennung mit der Airfuge zeigte unerwarteter Weise nicht nur einen Einfluss auf das Protein sondern auch auf die QDs. Auf LHCII-Ebene konnte in den Überständen nach Zugabe des Reduktionsmittels nur noch ein minimales Chl *b*-Signal beobachtet werden (Abb. 3.6.8 A). Die freien A7-N-Trimere schienen demnach weniger zerstört zu werden. Zusätzlich wurde hier nun auch ein QD-Signal bei 600 nm detektiert. Auch in den resuspendierten Pellets war nach DTT-Zugabe eine deutliche Erhöhung der QD-Fluoreszenz zu verzeichnen, ebenso war in dieser Probe die Intensität der LHCII-Fluoreszenz deutlich erhöht (Abb. 3.6.8 B). Eine dementsprechend höhere Bindung von A7-N an die QDs konnte allerdings durch Absorptionsspektren nicht bestätigt werden (ohne Abbildung).

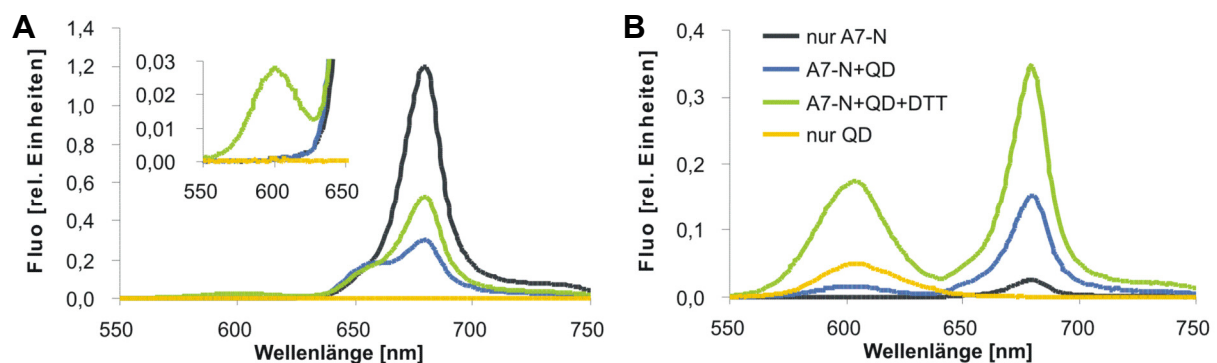


Abb. 3.6.8 Einfluss von DTT auf A7-N und DHLA-QDs.

A7-N-Trimere wurden in einem molaren Verhältnis von 2 mit DHLA-6xZnS-QDs mit und ohne 2 mM DTT inkubiert und über Dichtegradienten-Zentrifugation mit der Airfuge aufgetrennt. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände abgenommen und die Pellets resuspendiert. Beide Proben wurden mit QD-Saccharosegradientenpuffer auf 500 µl aufgefüllt und Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) aufgenommen. Als Kontrolle dienten jeweils gleichbehandelte Proben nur mit LHCII, bzw. QD. A) Überstände, B) resuspendierte Pellets.

Die Zugabe von Reduktionsmittel schien somit keinen maßgeblichen Einfluss auf die Menge von QD-gebundenem A7-N zu haben. Allerdings wurde eine deutlich höhere QD-Fluoreszenz hervorgerufen.

6.2.3 Erstellung von Bindungskurven

Mit den bisherigen Versuchen können nur Aussagen zu den Bindungseigenschaften der Klone bei gleichen Bedingungen getroffen werden. Um die Interaktion zwischen QD und LHCII aber besser verstehen und auch untersuchen zu können, bedarf es dagegen Bindungskonstanten. Daher sollte getestet werden, ob die Auftrennung durch Dichtegradienten-Zentrifugation mit der Airfuge auch für solche Versuche genutzt werden kann. Hierfür wurden gleiche LHCII-Mengen einer Mutante in unterschiedlichen [QD]/[LHCII]-Verhältnissen mit QDs verwendet. In diesem Fall wurden DHLA-Multishell-QDs verwendet.

Nach 90minütiger Inkubation der Proben wurden sie mit der Airfuge aufgetrennt und wieder die Überstände auf ihre darin enthaltenen freien LHCII-Trimere untersucht.

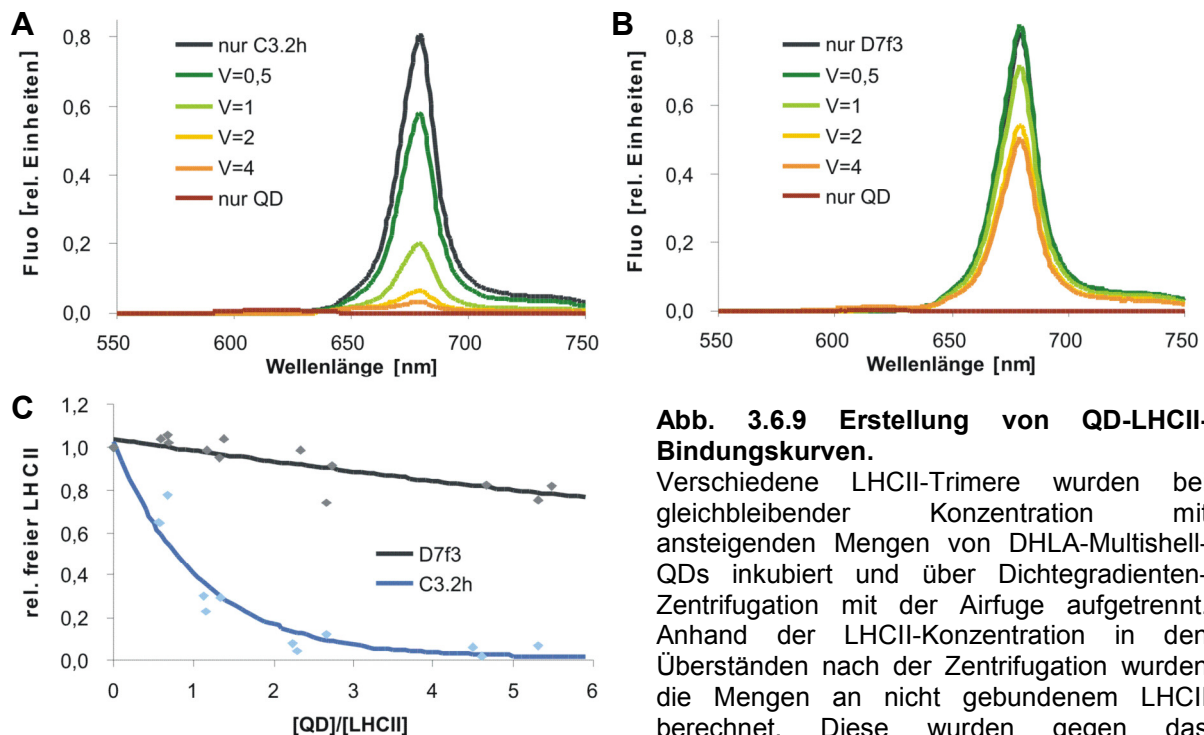


Abb. 3.6.9 Erstellung von QD-LHCII-Bindungskurven.

Verschiedene LHCII-Trimere wurden bei gleichbleibender Konzentration mit ansteigenden Mengen von DHLA-Multishell-QDs inkubiert und über Dichtegradienten-Zentrifugation mit der Airfuge aufgetrennt. Anhand der LHCII-Konzentration in den Überständen nach der Zentrifugation wurden die Mengen an nicht gebundenem LHCII berechnet. Diese wurden gegen das [QD]/[LHCII]-Verhältnis aufgetragen und ein

Graph den Daten angepasst. A) + B) Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) der Überstände nach Zentrifugation bei Verwendung von C3.2h-Trimeren (A) bzw. D7f3-Trimeren (B). C) Darstellung des nicht gebundenen LHCII als Originaldaten und in Form des angepassten Graphen.

Die Fluoreszenzemissionsspektren der Überstände zeigten mit zunehmenden QD-Mengen wie erwartet abnehmende LHCII-Fluoreszenz-Intensitäten (Abb. 3.6.9 A+B). Diese Abnahme war allerdings bei C3.2h sehr viel stärker ausgeprägt als bei D7f3. Anhand der Absorptionsspektren derselben Proben konnte die Mengen an nicht gebundenem LHCII berechnet werden. Diese wurden graphisch gegen das eingesetzte [QD]/[LHCII]-Verhältnis aufgetragen und ein Graph für ein Gleichgewichtssystem an diese Rohdaten mit dem Programm „Tablecurve“ angepasst (Abb. 3.6.9 C). Mit Hilfe dieses Graphen konnte anschließend das [QD]/[LHCII]-Verhältnis berechnet werden, bei dem 50% des eingesetzten LHCII an den QD gebunden hat. Bei C3.2h beträgt es 0,74, bei D7f3 dagegen 8,21. Hierdurch werden die unterschiedlichen Bindungseigenschaften der beiden LHCII-Mutanten noch mal bestätigt.

Es konnte also gezeigt werden, dass die Auftrennung von LHCII-QD-Proben durch Dichtegradienten-Zentrifugation mit der Airfuge durchaus auch für genauere Untersuchungen der Interaktion beider Komponenten genutzt werden kann.

IV Diskussion

1 Hybridkomplexe aus Farbstoffen und LHCII

Ein zentrales Thema der vorliegenden Arbeit war die Herstellung von Hybridkomplexen aus Fluoreszenzfarbstoffen und LHCII. Die hierfür verwendeten Farbstoffe unterschieden sich zum einen in ihrer Funktion als Energieakzeptor oder –donor für den LHCII, in ihrer funktionellen und für die Proteinbindung entscheidenden Gruppe, sowie in ihrer Zugehörigkeit zu verschiedenen Stoffklassen. Neben den eher technischen Fragestellungen nach effektiven Markierungsmethoden, die durch die Markierung hervorgerufenen Veränderungen des Proteins und/oder der Farbstoffe, und die Untersuchung des möglichen Energietransfers zwischen den verschiedenen Materialien, standen die weiterführenden Ideen der Füllung der Absorptionslücke des LHCII durch Bindung mehrerer Farbstoffe und der Verwendung von Rylen-Akzeptorfarbstoffen für Hybridkomplexe mit drei Komponenten.

1.1 Markierungen mit cysteinreaktiven Farbstoffen

Die Markierung mit cysteinreaktiven Substanzen stellt eine weitverbreitete Methode der Proteinbiochemie mit vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten dar. Auch der LHCII wurde schon in einigen Projekten auf diese Weise mit Fluoreszenzfarbstoffen für Zugänglichkeitsstudien, ein biomimetisches Modell eines Photosystems und Faltungskinetiken modifiziert (Huschenbett, 2001; Wolf-Klein et al., 2002; Horn et al., 2007). Die gute Handhabung der Methode und die geringe Auswirkung auf die Proteinstruktur legten die Nutzung für Hybridkomplexe nahe. In der vorliegenden Arbeit wurden die bisherigen Methoden um die gleichzeitige Markierung mit bis zu vier Farbstoffen für eine Füllung der Grünlückenabsorption erweitert. Entscheidend für eine spätere Verwendung solcher Komplexe sind dabei eine optimale Methode für die Mehrfachmarkierung sowie ein möglichst geringer Einfluss auf die Proteinstruktur.

1.1.1 Reaktionsbedingungen bei cysteinreaktiven Markierungen

Das Protokoll der cysteinreaktiven Markierung ist etabliert und wie oben erwähnt auch mehrfach am LHCII mit Erfolg genutzt worden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde diese Methode für die Reaktion von sieben verschiedenen Farbstoffen verwendet, wobei zum Teil leichte Veränderungen des Protokolls vorgenommen wurden. Daher sollen die entscheidenden Punkte für eine optimale Markierung im Folgenden besprochen werden.

Bei der Etablierung des Protokolls der Markierung am gefalteten LHCII wurden die Reaktionsparameter pH, Temperatur und Proteinkonzentration getestet. Letztere hatte dabei

den größten Einfluss auf die Markierungsausbeute (Abb. 3.1.13). Maleimide sind über einen großen pH-Bereich stabil, im Basischen kommt es allerdings zu einer Ringöffnung, wodurch die Reaktion mit Cysteinen unmöglich wird. Shafer et al. (2000) geben für diese Reaktion pH 9,3 als Schwellenwert an. Es ist daher erstaunlich, dass bei den hier durchgeführten Versuchen die Reaktionsausbeute bei pH 9,0 nur geringfügig im Vergleich zu pH 7,0 verringert wurde. Der positive Einfluss einer erhöhten Temperatur folgt dagegen dem allgemein geltenden Grundsatz, dass Reaktionen hier schneller ablaufen.

Der Erfolg einer höheren Proteinkonzentration lässt sich auf die dadurch bedingte größere Wahrscheinlichkeit zurückführen, dass sich Protein- und Farbstoffmoleküle treffen. Eine optimale Zugänglichkeit stellt darüber hinaus bei der gesamten Markierung den wohl wichtigsten Parameter dar. Stoßen sich der Farbstoff und die Proteinumgebung des Cysteins ab, kommt es zu einer verminderten Markierung (vgl. IV1.1.2). Ebenso scheint die Löslichkeit des Farbstoffes entscheidend zu sein. Der allgemein verwendete 15fach molare Farbstoffüberschuss liefert in der Regel optimale Markierungsausbeuten. Bei den stark hydrophoben Farbstoffen DNQDI und TMIMA bedarf es dagegen größerer Farbstoffmengen, um eine gleichwertige Markierung beobachten zu können (s. III2). Vermutlich integrieren diese Farbstoffe in die Detergenzmizellen, wodurch ihre Zugänglichkeit zum LHCII verringert wird – es sei denn beide befinden sich in derselben Mizelle. Die Notwendigkeit, den Reaktionsansatz bei einer Markierung mit TMIMA im Ultraschall zu inkubieren, liegt wahrscheinlich auch hierin begründet. DNQDI besitzt als einzige hydrophile Gruppe das Maleimid, welches folglich vermutlich aus der Mizelle herausragt und dadurch gut mit den Cysteinen des Proteins reagieren kann. TMIMA besitzt zusätzlich noch ein hydrophiles Carbonsäureanhydrid. Es ist daher durchaus denkbar, dass sich zwar beide hydrophile Gruppen am Rande der Mizelle befinden, die Größe der SDS-Moleküle allerdings dazu führt, dass die Maleimidgruppe nahe an der Mizellenoberfläche liegt und nur eingeschränkt zugänglich ist. Dieses würde natürlich die Reaktivität mit dem Protein beeinträchtigen.

Auch die Inkubationsdauer hat einen positiven Einfluss auf die Markierungsausbeute. Besonders bei hydrophoben Stoffen ist eine verlängerte Inkubation, vermutlich wegen der geringeren Zugänglichkeit, von Vorteil. Andererseits kann die Maleimidgruppe in derselben Zeit auch mit Luftsauerstoff reagieren, wodurch dann keine Markierung von Cysteinen mehr stattfinden kann. Die Markierungsreaktion verläuft aber in der Regel sehr schnell und somit spielt dies wohl nur bei der Lagerung der Stoffe eine entscheidende Rolle. Farbstoffe, die in Wasser gelöst werden, sollten daher immer erst direkt vor der Markierung gelöst werden.

Im Rahmen der Suche nach optimalen Reaktionsbedingungen wurde auch beobachtet, dass in der Rekonstitution die Ausbeute an trimerem LHCII drastisch durch die Verwendung von TCyEP statt β -ME verringert wird (Abb. Abb. 3.1.14). Dies erscheint zunächst verwunderlich, ist doch TCyEP ein stärkeres Reduktionsmittel als das üblicherweise

verwendete β -ME. Die Tatsache, dass spezifisch die Trimerisierung durch TCyEP gestört wird, eine Zugabe zu aufgereinigten Trimeren aber nicht destabilisierend wirkt, legt eine Wirkung auf der Ni-Säule nahe. Während DTT durch Metallionen oxidiert wird, bleibt TCaEP als Reduktionsmittel in Anwesenheit von diesen aktiv (Getz et al., 1999). Außerdem wurde von Shafer et al. (2000) beobachtet, dass TCaEP nicht durch Gelfiltration von der Proteinfraction getrennt werden kann. Beide Studien befassen sich zwar mit TCaEP, es scheint jedoch plausibel, für TCyEP trotz der fehlenden negativen Ladungen ähnliche Eigenschaften anzunehmen. Demnach würde TCyEP im Gegensatz zu β -ME durch die Waschschrte nicht von der Ni-Säule entfernt werden. Zusätzlich hätten die anwesenden Ni^{2+} -Ionen keinen negativen Einfluss auf seine Reaktivität. TCyEP könnte nun durch seine Anwesenheit auf der Säule entweder die Bindung des Proteins verschlechtern und/oder die Anlagerung von PG und somit die Trimerisierung der Monomere negativ beeinflussen. Es ist in diesem Sinne allerdings erstaunlich, dass die Trimerausbeute durch eine erhöhte TCyEP-Konzentration augenscheinlich verbessert wird. Es wäre aber denkbar, dass dies auf eine Streuung der Werte zurückzuführen ist, da der entsprechende Versuch nur einmal durchgeführt wurde (vgl. Christian, 2008). Daher ist trotz einer optimalen Nutzung für cysteinreaktive Markierungen von einer Verwendung von TCyEP in der Rekonstitution des LHCII abzuraten.

1.1.2 Markierungspositionen und -methoden

Die prinzipielle Funktionalität des LHCII nach cysteinreaktiver Markierung wurde auch in den hier vorliegenden Ergebnissen unter Beweis gestellt. Selbst bei der Markierung mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen gaben die Analysen des komplexinternen Energietransfers, des Absorptionsverhaltens, der CD-Spektroskopie, der Temperaturstabilität und der Pigmentstöchiometrien keinen Grund zu der Annahme, dass die Struktur des LHCII gravierend gestört sei (vgl. Wiegand, 2008, Werwie, 2009, Gundlach et al., 2009). Geringe Veränderungen an den unterschiedlichen Markierungspositionen waren dennoch zu beobachten und sollen hier, trotz der ausführlichen Betrachtung in den Arbeiten von Wiegand (2008) und Werwie (2009), noch einmal zusammenfassend aufgeführt werden.

Die Markierung an der dritten Aminosäure (S3C) war sowohl bei der Verwendung von DY731 als auch von Rho-Mal mit rund 60% vergleichsweise gering (s. III.1.2.1.1 und Gundlach et al., 2009). Die plausibelste Erklärung hierfür bildet die Nachbarschaft zu den positiven Aminosäuren Arg1 und Lys2. Auch beide Farbstoffe besitzen eine positive Ladung, wodurch eine ladungsbedingte Abstoßung die wahrscheinliche Ursache für eine verminderte Zugänglichkeit an die Position 3 darstellt. DY731 besitzt zwar auch zwei negativ geladene Sulfonsäurereste, diese liegen aber im Molekül an dem der Maleimidgruppe entgegen

gesetzten Ende und können daher nicht positiv auf die Markierungsausbeute wirken. Die erschwerte Ausbeutenbestimmung mit PDI-Mal ergab zwar einen weniger zweifelsfreien jedoch deutlich höheren Wert von rund 85%, bei der Markierung mit TDI-Mal ist sogar von einer nahezu vollständigen Markierung auszugehen (vgl. III1.1.1 und III2.2). Da beide Farbstoffe vier negativ geladene Sulfonsäurereste besitzen, scheinen diese Werte auch im Vergleich zu den anderen Farbstoffen durchaus nachvollziehbar und bestätigen die ladungsbedingte Zugänglichkeit.

Die Lage von S106C in der lumenalen Schleife bringt diese Markierungsposition in einen gut untersuchten aber noch nicht ganz verstandenen Kontext. Messungen an Neoxanthin-freiem LHCII (Hobe et al., 2006; Croce et al., 1999), die Analyse des CD-Signals von LHCII (Georgakopoulou et al., 2007), der Austausch von anderen Aminosäuren in der lumenalen Schleife (Liu et al., 2008; Yang et al., 2008) sowie EPR-spektroskopische Analysen dieses Bereiches (Dietz, 2008; Dockter, 2009) legen nahe, dass hier durch geringe Veränderungen der Proteinstruktur Regulationen der Funktionen des LHCII stattfinden. Dieser Bereich ist somit in wahrscheinlich engen Grenzen dynamisch. Dies bietet eine Erklärungsgrundlage für die bei der Markierung von S106C beobachtete Veränderung um 470 nm in CD- und Absorptionsspektren. So scheint auch durch den Farbstoff eine ähnliche Strukturänderung des Proteins trotz unveränderter Neoxanthin-Bindung hervorgerufen zu werden.

Im Gegensatz zu diesen beiden Positionen ist S160C sehr unproblematisch. Die hier in der stromalen Schleife markierten Komplexe zeigen keine Auffälligkeiten. Es wäre daher eine Überlegung wert, für weitere Versuche mit Einzelcysteinmutanten in Hybridkomplexen diesen Klon statt S3Ch als Standard zu verwenden, scheint es doch von den in 4xCh vorkommenden Cysteinen die einzige Position ohne Vorbehalte zu sein.

Die Betrachtung von S223C führt dagegen auch direkt zu der Frage, wie viele Farbstoffe an den LHCII gebunden werden können und welche die hierfür am besten verwendete Methode darstellt. Die Gewissheit, dass an Position 222 hydrophobe Aminosäuren für eine Trimerisierung des Komplexes notwendig sind (Kuttkat et al., 1996), legt eine Beeinflussung durch Farbstoffe in direkter Umgebung nahe. Dies wurde durch die Ergebnisse bestätigt, obwohl es davon abhängig ist, ob der verwendete Farbstoff eher hydrophob (DY731 und Rho-Mal) oder hydrophil (PDI-Mal) ist. Während PDI-Mal kaum Auswirkungen auf die Trimerausbeute hatte, war diese bei den hydrophoben Farbstoffen deutlich verringert (vgl. III1.2.1.4). Jedoch scheint eine Markierung am gefalteten Komplex diesen Verlust ein wenig zu minimieren. Folgende Erklärung ist für diese Beobachtung denkbar: Während der hydrophile Farbstoff in die umgebende wässrige Lösung hineinragt, wollen DY731 und Rho-Mal dieser entgehen und integrieren in die Detergenshülle (vgl. IV1.3). Hier unterbinden sie nun die hydrophoben Interaktionen der zwei angrenzenden Monomere und führen zu einer Destabilisierung des Komplexes. Auch die geringere Größe dieser beiden Farbstoffe könnte

die Einlagerung fördern, während sie durch die wesentlich längere Kohlenstoffkette zwischen Maleimidgruppe und Rylene-Farbstoff bei PDI-Mal verhindert wird. Wird nun der LHCII am Trimer markiert, muss die schon vorhandene Interaktion der Monomere durch die Farbstoffe gestört werden. Dies erscheint durchaus schwieriger, als von vorneherein die Ausbildung zu unterbinden. Dies führt allerdings womöglich zu einer schlechteren Zugänglichkeit der Aminosäure für den Farbstoff. Tatsächlich weisen 4xCh-Trimere unterschiedliche Markierungsausbeuten je nach der verwendeten Methode auf (Wiegand, 2008). Diese liegt bei einer Markierung des Ni-Säuleneluats geringfügig unter der Markierung am Apoprotein.

Diese Argumentation führt direkt zu einem Vergleich der zwei verwendeten Markierungsprotokolle. Die standardmäßige Markierung am Apoprotein ist etabliert und funktioniert bei den meisten Mutanten einwandfrei. Allerdings ist die Methode relativ zeitaufwendig. Das Protein muss zuerst markiert, dann aufgereinigt und anschließend rekonstituiert werden. Jeder dieser Schritte dauert ungefähr einen Tag und somit werden drei Tage bis zum Erhalt der gewünschten Komplexe benötigt. Die Markierung am Ni-Säuleneluat ist dagegen schon in nur einem Tag möglich. Gegen dieses Protokoll sprach bis jetzt die unvollständige Entfernung des freien Farbstoffs. Dieses kann jedoch möglicherweise mit der vorgeschlagenen Methode gelöst werden (vgl. IV1.3). Selbst dann wäre das Protokoll mit einer Dauer von zwei Tagen noch kürzer. Zusätzlich bietet die Markierung am gefalteten Komplex die Chance, für die Faltung entscheidende Bereiche nicht zu beeinflussen, sondern erst nach der Ausbildung aller wichtigen Interaktionen zusätzliche Moleküle einzufügen. Hierbei wird zwar möglicherweise die Markierungsausbeute verringert, sie muss jedoch nicht komplett gestört sein. Dies sollte allerdings für jeden Fall einzeln ausprobiert und analysiert werden. Daher wird wohl auch die Wahl der Methode je nach dem gewünschten Produkt unterschiedlich ausfallen.

Die Analyse der Position S223C wird so interpretiert, dass nicht die Zahl der gebundenen Farbstoffe, sondern die Lage der vierten Markierung im 4xCh die LHCII-Struktur beeinflusst. Daher konnte bis jetzt keine maximale Anzahl an Farbstoffmolekülen beobachtet werden, die von der Proteinstruktur sozusagen „ertragen“ werden kann. Um dieses erstaunliche biochemische Phänomen weiter zu untersuchen, oder aber um die Grünlücke noch effektiver zu füllen, ergibt sich entweder die Möglichkeit einer anderen Markierungsposition am C-Terminus oder aber einer weiteren Position in der N-terminalen Domäne. Gerade die letztgenannte Domäne ist sehr lang und einige weitere Cysteinmutanten ohne Einfluss auf die Proteinstruktur wurden von Müller (2008) hergestellt und untersucht. Es ist durchaus denkbar z.B. an den Positionen 11, 12, 14, 22 oder 34 einen zusätzlichen Farbstoff zu binden. Genauso liegt die Mutante S229C in der Arbeitsgruppe vor, welche auch ohne Auffälligkeiten rekonstituiert und markiert werden kann (Huschenbett, 2001). Allerdings

besitzt sie einen N-terminalen „His₆-tag“. Der Einfluss eines räumlich sehr nahen C-terminalen „His₆-tags“ wie in den hier verwendeten Mehrfach-Cystein Mutanten, muss noch untersucht werden. Dennoch scheint die Möglichkeit, noch weitere Farbstoffmoleküle an den LHCII zu binden, durchaus gegeben und es bleibt abzuwarten, wie viele davon „nötig“ sind, um die Proteinstruktur nachhaltig zu stören.

1.2 Markierungen mit aminoreaktiven Farbstoffen

Die Markierung von LHCII mit mehreren Farbstoffmolekülen für die Grünlückenfüllung wurde im Rahmen dieser Arbeit auch durch die Verwendung von aminoreaktiven Farbstoffen erreicht. Die entscheidenden Fragen, neben dem erhofften optimierten Absorptionsverhalten der Hybridkomplexe, waren die Lage der Bindungspositionen und der Einfluss der Farbstoffe auf die Struktur des LHCII.

1.2.1 Wo binden die aminoreaktiven Farbstoffe?

Für die aminoreaktiven Markierungen wurden die Farbstoffe PDI-NHS und Rho-NHS verwendet. Beide besitzen ein N-Hydroxysuccinimid-Ester als reaktive Gruppe. Dieser kann über einen nucleophilen Angriff mit deprotonierten primären Aminen reagieren (II.6.3.4). Für die Markierung von Proteinen kommen somit der freie N-Terminus und die ϵ -Aminogruppe von Lysinen in Frage. Auch Arginin besitzt eine primäre Aminogruppe. Ihre Reaktion mit NHS-aktivierten Molekülen ist zwar prinzipiell möglich, wird aber nur sehr selten beobachtet (vgl. Miller et al., 1997; Mädler et al., 2009). Zusätzlich liegt der pK-Wert von Arginin mit 12,5 in einem sehr basischen Bereich (Berg et al., 2003), weshalb unter den in dieser Arbeit verwendeten Reaktionsbedingungen nicht von einer Deprotonierung ausgegangen wird. Der LHCII besitzt zwölf Lysine, fünf von ihnen befinden sich in den Helices und sind daher bei der Markierung am gefalteten Komplex schwer zugänglich. Somit ergeben sich unter dem Strich acht potentielle Markierungspositionen: der N-Terminus und sieben Lysine (Abb. 4.1.1 A).

Die Anzahl der gebundenen NHS-Farbstoffe pro LHCII-Monomer konnte nur für die optimal aufgereinigte Probe Rho-C3.2h mit 2,36 bestimmt werden. In allen anderen Proben befand sich immer noch ungebundener Farbstoff (vgl. III.1.2.2.3), weshalb eine genaue Bestimmung über Absorptionsspektren nicht möglich war. Allerdings ergab sich selbst bei diesen verunreinigten Proben nie ein Wert von mehr als 6 Farbstoffmolekülen pro Monomer. Es ist also davon auszugehen, dass nicht alle Lysine für die Farbstoffe zugänglich sind. Hierfür sind grundsätzlich zwei Möglichkeiten in Betracht zu ziehen: Zum einen wäre es denkbar, dass nicht alle Lysine bei den verwendeten pH-Werten deprotoniert vorliegen. In einem Protein spielen gerade die benachbarten Aminosäuren für den lokalen pH-Wert eine

große Rolle. Dadurch können sich die Protonierungsgrade von Lysinen im Protein von denen der freien Aminosäure stark unterscheiden. Dieses Phänomen ist besonders durch die aktiven Zentren von Enzymen bekannt. Gerade diese lokalen Eigenschaften der einzelnen Lysine könnten aber auch Ursache des zweiten denkbaren Grundes einer nicht stattfindenden Markierung sein. So können lokal besonders hydrophobe oder –phile, positive oder negative Bereiche entstehen, die die Zugänglichkeit für Farbstoffe behindern. Es ist also davon auszugehen, dass bei weitem nicht alle potentiell denkbaren Markierungspositionen in den Komplexen auch tatsächlich markiert werden können.

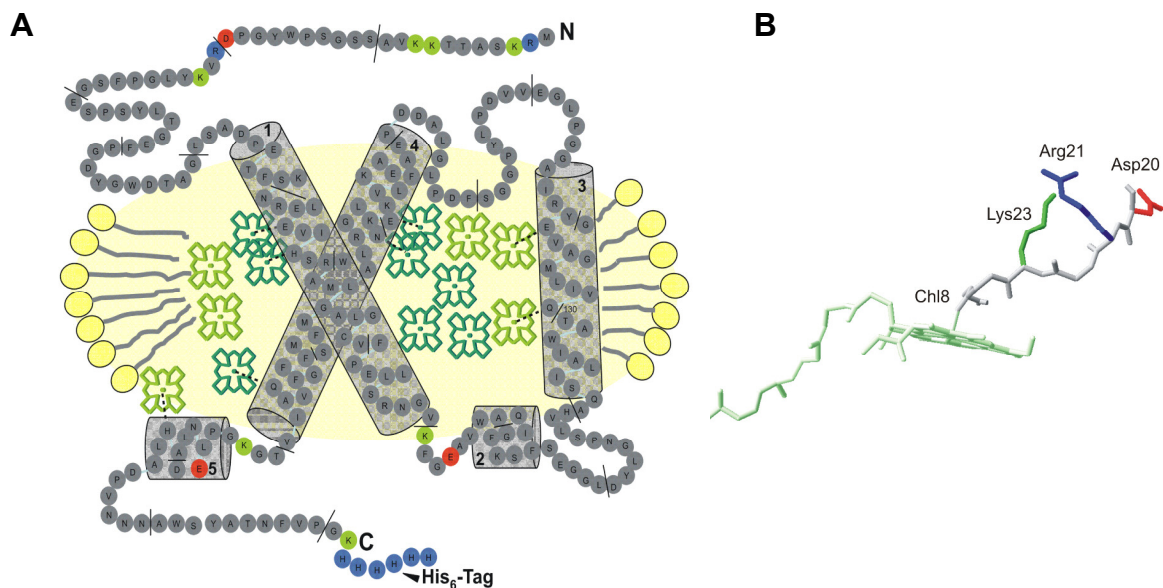


Abb. 4.1.1 Potentielle Markierungspositionen für aminoreaktive Farbstoffe.

A) Schematische Darstellung des LHCII in der Mizelle nach Volkov et al., 2009, grün – markierbare Lysine, rot/blau – negativ/positiv geladene Aminosäuren in deren Nähe, 1-5 – Bezeichnungen der Helices. B) Lage der Aminosäuren 20-25 und des Proteinrückgrats (grau) laut PDB-Eintrag 2BHW (Standfuss et al., 2005), dargestellt mit dem Swiss PDBViewer 4.0 (Guex & Peitsch, 1997).

Für die Überlegung der genauen Positionen der Farbstoffe bildet die Analyse der Proteinbanden nach Trypsinverdau im SDS-Gel einen Ausgangspunkt (s. Abb. Abb. 3.1.22). Demnach befanden sich an PDI-NHS markierten Komplexen zwei Drittel der Farbstoffe an den ersten acht Aminosäuren, an Rho-NHS markierten Komplexen dagegen nur ein Drittel. Unter der Annahme, dass alle Markierungspositionen in demselben Maße markiert wurden, müssten jeweils mindestens drei Farbstoffmoleküle je Monomer gebunden haben. Ein Gegenargument hierfür sind Ergebnisse von Huschenbett (2001). Sie zeigen, dass die Markierungseffizienz von cysteinreaktiven Farbstoffen an unterschiedlichen Positionen in LHCII-Trimeren durchaus verschieden ist. Als Basis für die Überlegungen nach den wahrscheinlichen Bindungspositionen, soll dennoch im Folgenden davon ausgegangen werden, dass an jeweils drei Aminosäuren Farbstoffe gebunden haben.

Unter den ersten acht Aminosäuren befinden sich mit dem N-Terminus und drei Lysinen schon vier der potentiellen Markierungspositionen. Von diesen sind zwei mit PDI-NHS und eine mit Rho-NHS markiert. Das erste Lysin an Position 2 befindet sich in räumlicher Nähe zum N-Terminus, die weiteren liegen an den Positionen 7 und 8 direkt nebeneinander. Es ist möglich, dass jeweils nur eine der potentiellen Möglichkeiten mit Farbstoffen markiert werden kann, da eine sterische und ladungsbedingte Behinderung bei der Markierung von benachbarten Aminosäuren durchaus denkbar ist. Damit wären die zwei PDI-NHS Moleküle erklärt. Rho-NHS dagegen bindet nur einmal in diesem Bereich. Dieser Farbstoff ist durch eine delokalisierte Ladung positiv geladen (vgl. IV1.1.2), weshalb es nachvollziehbar ist, dass die Markierung sowohl des N-Terminus als auch des Lys2 durch die positive Aminosäure Arginin an Position 1 gestört wird, und nur noch Lys7 bzw. Lys8 für eine Markierung in Frage kommen. Welche dieser beiden aber tatsächlich markiert ist, ist im Rahmen dieser Arbeit nicht zu klären. Denkbar ist eine Gleichverteilung auf beide Aminosäuren. Ein möglicherweise positiver Effekt durch die Orientierung der Seitenketten in das Lösungsmittel hinein ist nicht belegbar, weil dieser Bereich bisher nicht durch Strukturanalysen aufgeklärt wurde (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005). Die beobachtete Wasserzugänglichkeit N-terminaler Aminosäuren von Müller (2008) lässt jedoch, trotz fehlender Daten zur Position 8, vermuten, dass Lys7 und Lys8 gleichermaßen markiert werden können.

Die Pigmentanalyse von PDI-C3.2h ergab den Verlust von einem Chlorophyll-Molekül (vgl. III1.2.2.2). Eine mögliche Ursache ist, dass die Bindung des Farbstoffs die Interaktion zwischen Protein und Pigment stört. Dafür sollten diese beiden Aspekte in enger räumlicher Nähe stattfinden. Hierfür kommt die Markierung von Lys23 in Frage, da Chl8 mit Phe24 interagiert (Standfuss et al., 2005). Bei Rho-C3.2h ist dieser Pigmentverlust nicht zu beobachten. Entweder stört das kleinere Farbstoffmolekül die Interaktion nicht, oder der Farbstoff bindet nicht an diesem Lysin, wobei letzteres plausibler scheint. Die Umgebung von Lys23 könnte sowohl positiv durch Arg21 oder aber negativ durch Asp20 geladen sein. Der tatsächliche Abstand der ϵ -Aminogruppe von Lysin zu der Guanidgruppe des Arginin beträgt 4,6 Å, zu der Carboxylgruppe des Aspartats dagegen 7,5 Å (PDB-Eintrag 2BHW Standfuss et al., 2005, Abb. 4.1.1 B). Es ist also davon auszugehen, dass aufgrund der positiven Ladung Rho-NHS gar nicht erst an Lys23 bindet.

Die weiteren Rho-NHS Moleküle müssen demnach an den Lysinen der lumenalen Schleife, bzw. des C-Terminus binden. Lys232 befindet sich direkt neben dem „His₆-Tag“. Der pK-Wert von Histidin liegt mit 6,0 (Berg et al., 2003) deutlich unter dem hier verwendeten pH-Wert, eine Protonierung ist dennoch nicht vollständig auszuschließen, da die Mizelle das Protein von der wässrigen Lösung abschirmt und sich somit der tatsächliche pH-Wert an den Histidinresten unterscheiden kann (Dockter, 2009; vgl. IV1.6.2). Eine dadurch bedingte

positive Ladung würde eine Markierung mit Rho-NHS unwahrscheinlich machen. Damit blieben noch Lys91 und Lys203 für die Interaktion mit dem Farbstoff. Theoretisch könnte auch PDI-NHS an diese Aminosäuren binden. Allerdings wurden für die drei gebundenen Moleküle schon andere plausible Bindungspositionen diskutiert, womit eine Bindung an Lys91, 203 und 232 fragwürdig erscheint. Die Ursache für eine schlechte Interaktion mit diesen Aminosäuren könnte die im Vergleich zum N-Terminus weniger exponierte Lage darstellen. Der LHCII ist als Membranprotein nur durch Detergenz in wässriger Umgebung löslich. Dieses bindet besonders an die hydrophoben Bereiche der transmembranen Helices und somit in unmittelbarer Nähe zu Lys91 und 203 (Cardoso et al., 2009). Zum einen ist PDI-NHS sehr viel größer als Rho-NHS und könnte deshalb sterische Probleme bei der Integration in die Detergenzmizelle hervorrufen. Zum anderen ist PDI-NHS sehr hydrophil, wodurch es denkbar wäre, dass es in geringerer Anzahl als Rho-NHS in die Detergenzmizelle integriert und somit die Ausgangsposition für die Markierung von Lys91 und 203 schlechter ist (vgl. IV1.3).

Somit wird davon ausgegangen, dass PDI-NHS an den N-Terminus/Lys2, Lys7/Lys8 und Lys23 bindet, Rho-NHS dagegen an Lys7/Lys8, Lys91 und Lys203. Die Markierungspositionen hängen demnach stark von der Wahl des Farbstoffes ab.

1.2.2 Die Struktur des LHCII nach Markierungen mit aminoreaktiven Farbstoffen

Die Funktionalität des Energietransfers innerhalb des LHCII von Chl *b* zu Chl *a* ist ein entscheidendes Indiz für die Struktur des Komplexes. Dieser Energietransfer wurde sowohl in PDI-C3.2h als auch in Rho-C3.2h nicht gestört. Auch das CD-Signal im stationären Zustand gab keinen Hinweis für eine durch die Bindung von aminoreaktiven Farbstoffen hervorgerufene Strukturänderung des LHCII (vgl. III1.2.2.2). Dies ist in sofern erstaunlich, da bei PDI-C3.2h der Verlust eines Chlorophylls zu beobachten war, welcher womöglich durch die Bindung des Farbstoffs an Lys23 hervorgerufen wird (vgl. IV1.2.1). Allerdings befindet sich dieses Chl *b* in einer vergleichsweise peripheren Lage im Komplex. Studien zur Faltungskinetik des LHCII zeigen, dass die Bindung von Chl *a* sehr schnell erfolgt und die Bindung von Chl *b* eine letzte Stabilisierung des Komplexes darstellt (Horn et al., 2007; Dockter et al., 2009). Somit könnte der Verlust von Chl8 dennoch einen ansonsten korrekt gefalteten LHCII zur Folge haben. Das fehlende Chl *b*-Molekül ist aber vielleicht die Ursache für das veränderte Temperaturstabilitätsverhalten. Hier konnte für PDI-C3.2h ein ungewöhnlicher Verlauf des CD_{492 nm}-Signals festgestellt werden, weshalb kein Vergleich zu den Kontrollproben möglich war (Abb. 3.1.21). Um eine Aussage über die Stabilität von PDI-C3.2h machen zu können, sollte man daher einen anderen Monitor wählen, z.B. den Energietransfer innerhalb des Komplexes.

Für Rho-C3.2h galt dagegen eine zur unmarkierten Kontrolle vergleichbare Stabilität. Allerdings wurde bei den Analysen des optimal aufgereinigten Komplexes ein deutlicher Verlust der Chl *a*-Fluoreszenz sichtbar (vgl. III1.2.2.4). Die wahrscheinlichste Ursache hierfür ist eine verminderte Fluoreszenzquantenausbeute (Φ). Berechnet man den prozentualen Verlust, ergibt sich für $\Phi_{\text{Rho-C3.2h}}$ ein Wert von 11,5%. Der Wert ist zwar für die Berechnung des Energietransfers entscheidend, für die Verwendung der Komplexe in Anwendungen aber womöglich nicht. Die Quantenausbeute gibt den Prozentsatz des durch Fluoreszenz abklingenden Energieanteils der angeregten Moleküle wieder. Die tatsächlich aufgenommene Energie – und demnach auch für Anwendungen nutzbare Energie – muss hiervon nicht betroffen sein. Da kein wesentlicher Unterschied des LHCII-Anteils in den Absorptionsspektren im Vergleich zur unmarkierten Kontrolle zu erkennen war, wird dies auch hier so angenommen. Die Ursache der veränderten Quantenausbeute kann vielfältig sein. Gerade die Umgebung eines Moleküls ist hierfür entscheidend (vgl. IV1.5.1). Freie in der Probe befindliche Chlorophylle können sich als Aggregate an der Peripherie des LHCII anlagern und dessen Fluoreszenz löschen (Barros et al., 2008). Da die Aufreinigung der markierten Komplexe genau wie bei den unmarkierten Komplexen vorgenommen wurde, müsste dieser Effekt allerdings auch in der Kontrolle stattfinden. Diese wies jedoch eine deutlich höhere Quantenausbeute auf. Es wäre auch denkbar, dass Rhodamine eine Chlorophyllanlagerung fördern. Da jedoch bei vergleichbaren Cystein-markierten Komplexen keine veränderte Quantenausbeute beobachtet wurde (Werwie, 2009; Gundlach et al., 2009), scheint auch diese Möglichkeit ausgeschlossen. Somit ist die Ursache noch nicht geklärt.

1.3 Das Problem „freier Farbstoff“ bei der Markierung von rekonstituiertem LHCII

Sowohl bei der Markierung des LHCII im Ni-Säuleneluat mit cysteinreaktiven Farbstoffen als auch bei der von aufgereinigten Trimeren mit aminoreaktiven Farbstoffen befanden sich trotz nachfolgender Reinigungsschritte immer noch ungebundene Farbstoffe in den Proben (III1.2.1.4 und III1.2.2.3). Diese erschwerten zum einen die Analyse der Markierungsausbeute, zum anderen war eine genaue Prüfung des Energietransfers bei Verwendung von Donorfärbstoffen dadurch nicht möglich. Generell wird in Markierungsansätzen immer ein Überschuss an Farbstoff zugesetzt. Das Ziel der Reaktionen ist möglichst maximal markiertes Protein, wobei die Reaktion durch eine hohe Farbstoffkonzentration auf die Seite des markierten Proteins verschoben werden kann. Daher befindet sich allerdings nach der Markierung ein Vielfaches an Farbstoffmolekülen in der Probe, welche für die Weiterverwendung der Proteine entfernt werden müssen. Bei der

Markierung von LHCP wird das Apoprotein gefällt und gewaschen, um eine saubere Probe zu erhalten. Dies würde bei der Markierung von gefalteten Komplexen aber eine erneute Rekonstitution bedeuten. Da jedoch durch jeden dieser Schritte Protein verloren geht, bräuchte man eine beträchtliche Ausgangsmenge. So wurde für einen vergleichbaren Versuchsaufbau einer aminoreaktiven Markierung von C3.2h mit Rho-NHS 2 mg Protein als Ausgangsmenge verwendet. Nach der ersten Rekonstitution konnten 350 µg (17,5% der Ausgangsmenge) Trimere für die Markierung eingesetzt werden, am Ende der anschließenden Fällung fand man noch 80 µg (4% der Ausgangsmenge, 23% der Trimere) wieder. Dies war nicht mehr genug, um eine verwertbare Trimerprobe nach der endgültigen Rekonstitution zu erhalten (III1.2.2.4). Um den großen Materialverlust zu umgehen, wurden deshalb alternative Methoden verwendet, um die überschüssigen Farbstoffmoleküle aus den LHCII-Proben zu entfernen.

Bei der Markierung der aminoreaktiven Farbstoffe erfolgte die standardmäßige Aufreinigung für PDI-NHS mit „Solid support“. Die Aminogruppen auf deren Oberfläche reagieren mit dem Farbstoff und eine anschließende Filtration trennt den „Solid support“ inklusive der nicht an das Protein gebundenen Farbstoffe von den markierten Proteinen (Peneva et al., 2008a). Diese Vorgehensweise war bei der Markierung mit Rho-NHS nicht erfolgreich. Hier konnte kaum eine Reaktion von Farbstoff und „Solid support“ beobachtet werden. Stattdessen wurden diese Komplexe durch Gelfiltration aufgereinigt, wobei die kleineren Farbstoffmoleküle langsamer durch die Säule laufen, als die mehrere Größenordnungen schwereren LHCII-Trimere. Dennoch konnte sowohl bei PDI-NHS als auch bei Rho-NHS nach mehrmaliger Aufreinigung noch freier Farbstoff in den Proben gefunden werden (vgl. III1.2.2.3). Der unterschiedliche Erfolg des „Solid supports“ gibt dabei einen Hinweis auf die mögliche Ursache. Wahrscheinlich ist die Reaktion mit Rho-NHS durch deren weniger hydrophile Eigenschaften erschwert. Im Gegensatz zu PDI-NHS, das selbst im reinen Wasser sehr gut löslich ist, löst sich Rho-NHS nicht ohne weiteres in wässriger Lösung. Wahrscheinlich inseriert es daher vorzugsweise in die Detergenzmizellen – und ist nicht mehr für eine Reaktion mit dem „Solid support“ zugänglich. Die Einlagerung in Detergenzmizellen stellt auch die wahrscheinlichste Ursache für die wenig erfolgreiche Aufreinigung dar. So können sich nicht kovalent gebundene Farbstoffe innerhalb der LHCII-Mizelle befinden und auf diese Weise auch nicht durch Gelfiltration von den Proteinkomplexen getrennt werden. Die unterschiedliche Präferenz für die Detergenzmizellen wurde auch bei Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 550 \text{ nm}$; Abb. 3.1.23) deutlich. Hier ergab sich für Rho-NHS eine geringere Fluoreszenzlöschung als für PDI-NHS, was auf einen größeren Anteil freien Farbstoffs zurückzuführen ist.

Um die Insertion der Farbstoffmoleküle in die Detergenzmizelle rückgängig zu machen bzw. wenigstens eine Aufteilung von LHCII und freien Farbstoffmolekülen in verschiedene

Mizellen zu erreichen, muss vermutlich die gesamte Detergenzhülle ausgetauscht werden. Dies wird z.B. durch die Auftrennung im Saccharosedichtegradienten erreicht, weshalb diese Methode getestet wurde. Ein Hinweis für den Erfolg der Methode gibt die Betrachtung der unterschiedlich postulierten Markierungsausbeuten für S3Ch mit DY731 bei Boggasch (2006) und Christian (2008) bzw. Wiegand (2008). Gibt Boggasch eine Markierungseffizienz von 90% an, so beträgt sie bei Christian und Wiegand nur 50 und 65%. Der Unterschied liegt dabei im Zeitpunkt der Berechnung. Boggasch bestimmte die Markierungseffizienz am Apoprotein vor der Rekonstitution, Christian und Wiegand dagegen am gefalteten Komplex nach Aufreinigung im Dichtegradienten. Es scheint, als ob auch in diesen Versuchen noch freier Farbstoff vorhanden war, der erst durch die Ultrazentrifugation entfernt wurde.

Die Markierung des Ni-Säuleneluats mit aminoreaktiven Farbstoffen ergab zwar eine Trimerprobe, die keine freien Farbstoffmoleküle mehr enthielt, allerdings waren die Trimere nicht sehr effizient markiert. Nicht korrekt oder gar nicht gefaltete Proteine im Ni-Säuleneluat reagierten in einem viel größeren Maße mit den Farbstoffen und verringerten somit die Markierung der Trimere, wobei die Apoproteinbande im Gradienten auch viele nicht kovalent gebunden Farbstoffe aufwies (vgl. Abb. 3.1.24). Gut markierte und saubere Rho-C3.2h Hybridkomplexe erhielt man dagegen, wenn zuerst reine Trimere hergestellt wurden, bevor markiert und aufgereinigt wurde. Es ist möglich, dass eine vergleichbare Vorgehensweise auch bei der Markierung mit cysteinreaktiven Farbstoffen erfolgreich ist und damit das Problem dieser Markierungsvariante gelöst werden kann.

1.4 Kann die Grünlücke der LHCII-Absorption gefüllt werden?

Für die mögliche Verwendung des LHCII in Anwendungen zur Nutzung von Lichtenergie wäre es sehr vorteilhaft, wenn die geringe Absorption des Pigment-Protein-Komplexes zwischen 500 und 600 nm optimiert werden würde. Ein ähnliches Problem ergibt sich auch bei der Verwendung von Zink-Chlorin-Antennen in biomimetischen Modellen und wurde dort durch die kovalente Verknüpfung mit einem Naphthalen-Farbstoff, welcher in der sogenannten Grünlücke absorbiert minimiert (Röger et al., 2006). Ein Hinweis, dass dies auch bei dem LHCII funktionieren könnte, ergaben Versuche von Razinkov et al. (1994), in denen isolierte Thylakoidmembranen mit Rhodaminfarbstoffen inkubiert wurden, wodurch eine verstärkte Anregung in der Grünlücke beobachtet werden konnte. In der hier vorliegenden Arbeit wurde nun analog der rekombinante LHCII mit Fluoreszenzfarbstoffen, die zwischen 500 und 600 nm absorbieren, kovalent markiert und Veränderungen in der Absorption bzw. Emission untersucht. Es stellte sich dabei heraus, dass es pro LHCII-Monomer mehrerer Farbstoffe bedarf, um die sogenannten Grünlücke effizient zu füllen. Dieses wurde auf zwei unterschiedlichen Wegen erreicht: zum einen durch die Reaktion von

Maleimid-funktionalisierten Farbstoffen mit Cysteinen, zum anderen durch die Verwendung von Farbstoffen mit einem N-Hydroxysuccinimid-Ester, welcher mit deprotonierten Aminogruppen reagiert. Der Vergleich dieser beiden Methoden sowie eine genauere Betrachtung des Energietransfers sollen im Folgenden diskutiert werden.

1.4.1 Welche Markierungsmethode ist besser?

Sowohl die Markierung mit cysteinreaktiven als auch die mit aminoreaktiven Farbstoffen führte zu einer Füllung der Grünlücke. Während die Anwendung von Maleimid-funktionalisierten Farbstoffen in der Arbeitsgruppe sehr etabliert ist, musste die Verwendung von NHS-Farbstoffen erst optimiert werden. Dennoch war es am Ende in beiden Fällen möglich, mehrere Farbstoffe an den LHCII zu binden, wobei dieser in seiner Struktur kaum beeinflusst wurde. Während die maximale Zahl der Farbstoffe bei der aminoreaktiven Markierung unter den verwendeten Bedingungen auf maximal drei beschränkt zu sein scheint (vgl. IV1.2.1), ist es bei der cysteinreaktiven Markierung durchaus denkbar, auch mehr als drei oder vier Farbstoffe an den LHCII zu binden (vgl. IV1.1.2). Generell ist die Reaktion von Maleimid-Farbstoffen sehr spezifisch und kontrollierbar. Die Wahl der genauen Markierungsposition ermöglicht es, im Voraus Strukturveränderungen des Proteins zu umgehen bzw. im Nachhinein leichter zu interpretieren. Bei der Markierung der Aminogruppen im Protein ergeben sich dagegen sehr viel mehr potentielle Markierungspositionen. Eine Zuordnung der Gruppen, die tatsächlich mit Farbstoff reagiert haben, ist viel theoretischer. Dennoch war bei der Verwendung von Rho-NHS keine gravierende Strukturänderung des Proteins zu beobachten.

Die Wahl des Farbstoffs scheint bei der aminoreaktiven Markierung eine entscheidende Rolle zu spielen. Je nach Ladung und Hydrophobizität werden unterschiedliche Positionen im Protein markiert (vgl. IV1.2.1). Bei cysteinreaktiven Farbstoffen ist dagegen diese Heterogenität weitaus geringer ausgeprägt. Dennoch zeigen beide Markierungsmethoden bei der Verwendung von Rhodamin eine vergleichbare Füllung der Grünlücke auf Absorptionsebene, wobei der Energietransfer bei Rho-Mal etwas effektiver erscheint (vgl. IV1.4.2). Die Schwierigkeit, den freien Farbstoff nach einer aminoreaktiven Markierung komplett zu entfernen, wurde zwar im Laufe der Arbeit behoben, dennoch kann sie zusammen mit dem Verlust der LHCII-Quantenausbeute nach Markierung mit Rho-NHS als Nachteil gewertet werden. Ein Argument gegen die Verwendung von Maleimid-Farbstoffen ist dagegen der größere zeitliche Aufwand.

Beim Vergleich dieser Punkte fällt es schwer, eine tatsächlich bessere Methode zu bestimmen. Für beide Seiten gibt es zahlreiche Vor- und Nachteile. Es erscheint dennoch sinnvoll, das etabliertere Protokoll der cysteinreaktiven Markierung für die Markierung von

drei bis möglicherweise fünf Farbstoffen zu nutzen. Sollte jedoch eine noch größere Anzahl Farbstoffmoleküle pro LHCII-Monomer gebunden werden, könnten beide Protokolle miteinander verbunden werden. Die Markierungspositionen von Maleimid- und NHS-Farbstoffen befinden sich in einem minimalen Abstand von fünf Aminosäuren (S3C zu Lys7). Alle weiteren Abstände sind deutlich größer, weshalb eine Einschränkung der Zugänglichkeit als unwahrscheinlich gilt (Cysteine: 106, 160, 223; Lysine: 91, 203). Eine solche „Vielfach-Markierung“ könnte natürlich einen Verlust der korrekten Proteinstruktur zur Folge haben. Die bisherigen Ergebnisse zeigen allerdings, dass der LHCII stabiler ist, als erwartet wurde.

1.4.2 Energietransferbetrachtungen

In allen analysierten Hybridkomplexen zur Grünlückenfüllung konnte eine starke Löschung der Donorfluoreszenz beobachtet werden. Da die minimalen Abstände zwischen Farbstoff und Chlorophyll in allen Fällen nicht geringer als 2 nm sind, wird von Fluoreszenz-Resonanz Energietransfer (FRET) nach Förster ausgegangen (Miller, 2005). Die Fluoreszenz der Farbstoffe (Donor) und die Absorption der Chlorophylle des LHCII (Akzeptoren) liegen günstig zueinander, wodurch die Försterradien mit durchschnittlich 5 nm deutlich größer sind als diese minimalen Abstände. Es wird daher eine Effizienz des Energietransfers von >95% erwartet (Tabelle IV.1). Diese bezieht sich allerdings nur auf ein einzelnes Farbstoff-Chlorophyll Paar. In den Hybridkomplexen waren aber jeweils mehrere Farbstoffe gebunden und es ist davon auszugehen, dass sie jeweils zu allen Chlorophyllen des LHCII Energie transferieren können, weshalb die tatsächliche Effizienz höher liegen dürfte. Bei der weiteren Auswertung ergab der Flächenvergleich von Donorlöschung zu sensibilisierter Akzeptorfluoreszenz einen dem Quotienten der Quantenausbeuten vergleichbaren Wert. Dies wird als weiteres Argument für einen funktionierenden Energietransfer nach dem FRET-Prinzip angesehen.

Bei der Betrachtung der einzelnen Hybridkomplexe gab es dennoch Unterschiede. Für PDI-C3.2h konnte aufgrund der Verunreinigung mit freiem Farbstoff nur eine geringe Löschung der Donorfluoreszenz beobachtet werden. Es wurde außerdem aufgrund dieses Problems auf weiterführende Untersuchungen des Energietransfers verzichtet. Weiterhin gelten die in Tabelle IV.1 angegebenen Werte nur unter der Voraussetzung, dass entgegen der Diskussion in Kapitel IV1.2.1 Chl8 an Phe24 gebunden ist. Die Abstände der weiteren Markierungspositionen N-Terminus/Lys2 und Lys7/Lys8 konnten jedoch aufgrund von fehlenden Strukturdaten nicht ermittelt werden, weshalb die Werte für Lys23 angegeben wurden. Es ist trotzdem anzunehmen, dass sich dieser Farbstoff-LHCII-Komplex in seiner Fähigkeit des Energietransfers nicht wesentlich von den näher untersuchten unterscheidet.

Tabelle IV.1 Försterradien (R_0) von Farbstoffen der Grünlückenfüllung und Chl *a* bzw. *b*.

Der Abstand zwischen dem nächsten Chlorophyll und dem Farbstoff wurde anhand des PDB-Eintrags 2BHW (Standfuss et al., 2005) mit dem Swiss PDBViewer 4.0 (Guex & Peitsch, 1997) ermittelt, es wurde der Abstand Farbstoff-Aminosäure hinzugerechnet (vgl. II7.4.5). Angegeben ist außerdem die Markierungsposition, für die der Abstand gilt (Aminosäure).

	R_0 [Å]		Nächstes Chl / Amino- säure	Abstand Chl – Farbstoff [Å]	Erwarteter Energietransfer [%]
	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>			
PDI-Mal	55,0	53,0	11 / 160	29,3	97,2
PDI-NHS	54,4	52,0	8 / 23*	22,8*	99,3*
Rho-Mal	47,5	46,2	11 / 160	19,3	99,5
Rho-NHS	47,1	46,6	3 / 203	24,7	97,9

* Werte setzen die Bindung von Chl8 an Phe24 voraus (vgl. IV1.2.1).

Die Markierung von C3.2h mit Rho-NHS ergab mit 87% eine im Vergleich zu Markierungen mit cysteinreaktiven Farbstoffen unvollständige Löschung der Donorfluoreszenz. Zwei mögliche Gründe sollen hierfür angegeben werden. Zum einen erscheint es denkbar, dass sich trotz der optimierten Aufreinigung noch geringe Mengen an freiem Farbstoff in der Probe befanden. Diese konnten ihre Energie nicht auf die Chlorophylle übertragen und somit wurde eine unvollständige Löschung beobachtet. Zum anderen ist der minimale Abstand zwischen Rho-NHS und Chlorophyll ca. 0,5 nm größer als bei Rho-Mal. Dies führt für dieses Donor-Akzeptor-Paar zu einem geringeren erwarteten Energietransfer (Tabelle IV.1). Somit könnte trotz vollständig gebundener Farbstoffe die unvollständige Donorlöschung auf einen Energietransfer mit geringerer Effizienz zurückzuführen sein.

Für die Betrachtung des Energietransfers anhand der berechneten Größen ist es entscheidend, dass sich weder Farbstoff noch LHCII in ihren Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften durch die Markierung verändern. Dies ist nicht für alle untersuchten Hybridkomplexe der Fall. Während für die verwendeten Rho-Farbstoffe keine Veränderungen beobachtet werden, scheinen die PDI-Farbstoffe in ihren Eigenschaften variabel (vgl. IV1.5.1). Beim LHCII zeigten sich auf Absorptionsebene nur geringe Veränderungen um 470 nm, welche mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit auf die Markierung an der Position 106 zurückzuführen ist (IV1.1.2). Da jedoch für den Energietransfer in der Grünlücke nur die Absorption der Q_y -Region entscheidend ist, stellte dies keine Probleme für weitere Betrachtungen dar. Die Fluoreszenzeigenschaften des LHCII zeigten nach Markierung mit cysteinreaktiven Farbstoffen keine Veränderung (vgl. Werwie, 2009). Bei Markierung mit aminoreaktiven Farbstoffen konnte jedoch eine verringerte Fluoreszenz nach Anregung bei 470 nm beobachtet werden. Die wahrscheinlichste Erklärung ist eine Verringerung der Quantenausbeute (vgl. IV1.2.2). Der Vergleich der sensibilisierten Akzeptorfluoreszenz zur Löschung der Donorfluoreszenz ergab den gleichen Wert wie der

Vergleich der Quantenausbeuten unter Einbeziehung der Änderung für den LHCII (vgl. III1.2.2.4). Jedoch auch im Vergleich zu der ursprünglichen LHCII-Quantenausbeute erscheinen beide Werte in annähernd derselben Größenordnung, weshalb auch bei diesen Werten FRET plausibel erscheint. Da bei diesen Hybridkomplexen, wie oben erwähnt, keine Änderung der LHCII-Absorption beobachtet wurde, ist demnach die veränderte LHCII-Fluoreszenz nicht gravierend.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei allen Betrachtungen ein sehr effizienter Energietransfer nach dem FRET-Prinzip beobachtet wurde und plausibel erscheint. Berücksichtigt man die spektralen Veränderungen einzelner Komponenten, können diese Argumente noch verstärkt werden, es ist aber nicht die Voraussetzung für eine FRET-Diskussion.

1.4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Optimierung der Absorption des LHCII zwischen 500 und 600 nm ist durch die Markierung mit mehreren Farbstoffen geglückt. Voraussetzung für den Erfolg ist allerdings ein möglichst großer Extinktionskoeffizient des verwendeten Farbstoffes. Die in dieser Arbeit untersuchten PDI-Farbstoffe scheinen daher für die Aufgabe nicht geeignet, obwohl ihre Eigenschaft, in Wasser ohne weiteres löslich zu sein, für die Markierung des LHCII von Vorteil ist. Sie verringert die Einlagerung der Farbstoffe in die Detergenzhülle und erleichtert auf diese Weise zum einen die Aufreinigung markierter Komplexe, zum anderen verringert sich dadurch der Einfluss auf die Proteinstruktur.

Die beobachtete Grünlückenfüllung kann durch eine vergrößerte Farbstoffanzahl womöglich noch gesteigert werden. Hierfür erscheint die Verbindung von cystein- und aminoreaktiven Farbstoffen als Möglichkeit, wobei es spannend sein wird, zu erfahren, wie viele Farbstoffe kovalent an den LHCII gebunden werden können, bevor die Proteinstruktur nachhaltig gestört wird. Hybridkomplexe aus LHCII und Farbstoffen, die das sichtbare Licht maximal absorbieren und übertragen können, sind optimale Lichtantennen und können sowohl in DSSCs, als auch in Zusammenhang mit QDs des Typs II zum Einsatz kommen.

1.5 Markierungen mit Rylenfarbstoffen

Die hier vorliegende Arbeit wurde im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus Müllen, MPI für Polymerforschung, angefertigt, wobei der LHCII mit ausgewählten Rylenfarbstoffen dieser Arbeitsgruppe markiert wurde. Insgesamt kamen sieben Rylenfarbstoffe in LHCII-Farbstoff-Hybridkomplexen zum Einsatz und aufgrund ihrer

Zugehörigkeit zu einer Stoffklasse sollen hier ausgewählte Charakteristika dieser Hybridkomplexe diskutiert werden.

1.5.1 Markierungsausbeute und Energietransfer

Der erste Rylene Farbstoff, der in dieser Arbeit verwendet wurde, war PDI-Mal. Obwohl die Markierung der LHCII-Mutante S3Ch mit diesem Farbstoff erfolgreich war, ergaben sich Probleme bei der Bestimmung der genauen Markierungsausbeute (vgl. III1.1.1). Die Berechnung anhand des Absorptionsspektrums des ungefalteten markierten Proteins ergab dabei nur eine Ausbeute von 31%, welche im Vergleich zu Ergebnissen durch Nachmarkierung mit einem anderen cysteinreaktiven Farbstoff fragwürdig erschien. Daher wurde im Folgenden versucht, das in der Probe befindliche unmarkierte Protein vom markierten Protein möglichst vollständig zu trennen und auf diese Weise die Markierungsausbeute bestimmen zu können. Eine denkbare Möglichkeit stellte dabei die Trennung beider Proteinpopulationen mit FPLC durch Anionenaustauscher-Chromatographie dar. Ein vergleichbarer Ansatz wurde schon von Wolf (1998) für Cy5.5 markierten LHCP verfolgt. Genau wie PDI-Mal besitzt auch Cy5.5 vier potentiell negativ geladene Sulfonsäurereste, welche ein verzögertes Eluieren des markierten Proteins zur Folge haben sollten. In dem damaligen Ansatz konnte zwar ein geringfügiger Laufunterschied beider Proteinpopulationen beobachtet werden, eine Optimierung der Methode zur vollständigen Trennung gelang jedoch nicht. Es wurde angenommen, dass der Einfluss der zusätzlichen negativen Ladungen überschätzt worden war. Auch in der hier vorliegenden Arbeit konnten erste Anzeichen einer Trennung beobachtet werden, so wiesen die Elutionsdiagramme von PDI-S3Ch zwei proteinhaltige Maxima auf, von denen nur das zweite fluoreszierendes Protein enthielt, jedoch eluierte auch das unmarkierte Protein in zwei Peaks. Das Größenverhältnis dieser beiden Maxima war bei dem markierten S3Ch allerdings deutlich auf Seiten des zweiten, fluoreszierenden Peaks verschoben (Abb. 3.1.4 und Abb. 3.1.5). Es wäre denkbar, dass das unmarkierte Protein sowohl in dem frühen als auch in dem späten, das markierte dagegen nur im späten Peak eluiert. Die Ursache könnte in der Löslichkeit des LHCP in Harnstoff liegen. Dieser ist gerade bei $\text{pH} < 8$ nur zu einem begrenzten Teil in 8 M Harnstoff löslich, weshalb im Rahmen dieser Arbeit eine Mischung aus Harnstoff, Thioharnstoff und CHAPS verwendet wurde. Um keine Proteinaggregate auf die Säule zu geben, wurde die Proteinlösung zusätzlich direkt vor dem Auftrag zentrifugiert und nur der Überstand auf die Säule geladen. Womöglich aggregierte das Protein auf der Säule aber erneut und eluierte in zwei Fraktionen. Das markierte Protein könnte dagegen aufgrund der zusätzlichen Ladungen besser löslich sein und daher in einer einzigen Fraktion von der Säule eluieren. Es wurde zwar versucht, das Problem der Löslichkeit durch den verbesserten Puffer zu umgehen, dies scheint aber nicht gelungen. Außerdem könnte ein

geringer Einfluss der zusätzlichen negativen Ladungen dazu führen, dass beide Proteinpopulationen zu schnell nacheinander eluieren. Es ist aber nicht auszuschließen, dass eine weitere Optimierung der Methode schließlich zum gewünschten Erfolg führen kann.

Als weitere Trennungsmethoden wurden verschiedene Gelelektrophoresesysteme getestet. Obwohl dies bei der Markierung von S3Ch mit DY731 (vgl. Lion, 2005) und Rho-Mal (vgl. Huschenbett, 2001) zu einer Trennung der beiden Proteinpopulationen führte, war dies für PDI-S3Ch in keinem der untersuchten Systeme der Fall (Abb. 3.1.6). Dies scheint erstaunlich, da PDI-Mal mit ~ 1,5 kDa deutlich größer als DY731 oder Rho-Mal ist und somit hier erst recht mit einer retardierten Laufweite gerechnet wurde. Ein unerwartetes apparentes Molekulargewicht konnte in anderen Arbeiten auch bei Silaffin-ähnlichen Proteinen beobachtet werden. Die vielen positiven Ladungen der Proteine führen dazu, dass das apparente Molekulargewicht deutlich größer ist, als das tatsächliche (Hippmann, 2005; Roos, 2008). Es wäre daher denkbar, dass in dem hier vorliegenden Beispiel die negativen Ladungen des Farbstoffs den genau entgegengesetzten Einfluss haben und das apparente Molekulargewicht kleiner ist als das tatsächliche. Dadurch läuft das markierte Protein wider Erwarten auf derselben Höhe wie das unmarkierte Protein. Interessanter Weise gilt dies nicht für eine Markierung an der Position 160. Die Lage des Farbstoffs in der Mitte der Peptidkette scheint diesen Effekt aufzuheben. Womöglich werden die negativen Ladungen des Farbstoffs hier von räumlich nahen Aminosäuren abgeschirmt und das Laufverhalten allein durch das Molekulargewicht beeinflusst. Dieser Laufunterschied von PDI-S160Ch erbrachte endlich den dritten Weg, die Markierungsausbeute zu bestimmen. Hier ergab sich mit rund 85% ein ähnlicher Wert wie bei der Nachmarkierung mit Bodipy. Es wurde daher angenommen, dass tatsächlich ein Großteil des Proteins mit PDI-Mal markiert ist. Die geringen Werte für die Berechnung anhand der Absorptionsspektren legen dagegen nahe, dass sich der Extinktionskoeffizient von PDI-Mal durch die Bindung an das Protein verringert.

Eine Veränderung des Extinktionskoeffizienten durch die Bindung ans Protein scheint auch bei anderen, in dieser Arbeit verwendeten Rylene-Farbstoffen möglich. Gelelektrophoretische Untersuchungen von aufgereinigtem PDI-R1Ch legen eine Markierungsausbeute von rund 80% nahe, die Berechnung anhand der Absorptionsspektren ergab dagegen nur 40% (vgl. III.3.1.2). Bei der Nachmarkierung von DNQDI-S3Ch mit Bodipy wurden als Summen der Markierungsausbeuten nur Werte um 50% erreicht (vgl. III.2.1). Da in vorherigen Arbeiten nie eine veränderte Bodipy-Absorption nach Proteinmarkierung beobachtet wurde, erscheint auch hier eine Veränderung der DNQDI-Absorption als mögliche Ursache. Auch bei der Verwendung von TMIMA gab es bei der Berechnung der Markierungsausbeuten durch Absorptionsspektren Auffälligkeiten. Die anfänglich sehr

geringe Ausbeute von 5% konnte zwar auf 26% erhöht werden (vgl. III.2.3.1). Dieser Wert erscheint aber im Vergleich zu Ausbeuten mit anderen Farbstoffen erstaunlich klein. Der Versuch die Markierung durch einen höheren Farbstoffüberschuss (50fach statt 30fach) bzw. einen anderen pH zu optimieren, war nicht erfolgreich. Es wurden auch hier nur Werte von rund 30% erreicht (unveröffentlichte Ergebnisse, Mara Werwie). Es erscheint daher plausibel, dass dies einer optimalen Markierung entspricht, wobei der Extinktionskoeffizient von TMIMA deutlich geringer wäre als erwartet.

Gerade bei TMIMA liegt eine Ursache für ein verändertes Absorptionsverhalten nahe. Die Spektren des Farbstoffs vor und nach der Bindung an S3Ch zeigen eine deutliche Verschiebung der Maxima. Eine solche Veränderung wird sowohl am nicht-funktionalisierten TMIMA wie auch bei Perylenen mit Carbonsäureanhydriden beobachtet und jeweils auf die Öffnung des Carbonsäureanhydrids zurückgeführt (Edvinsson et al., 2009; Edvinsson et al., 2007). Diese Öffnung hat zusätzlich auch eine verringerte Fluoreszenz zur Folge – ein Einfluss auch auf die Absorptionsstärke scheint daher durchaus möglich. Dieses Phänomen lässt sich dagegen weder für PDI-Mal, PDI-TE oder DNQDI anwenden, da diese Farbstoffe kein Carbonsäureanhydrid besitzen. Allerdings verändert sich der Extinktionskoeffizient von PDI bei der Funktionalisierung: liegt dieser beim nicht-funktionalisierte PDI zwischen $29.700\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ und $27.800\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Tang et al., 2007; Qu et al., 2004), findet man bei PDI-Mal nur noch einen Wert von $16.200\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Peneva et al., 2008a). Dies entspricht einer Verringerung um rund 45%. Es ist daher denkbar, dass auch die Bindung an das Protein den Extinktionskoeffizienten verändert. Eine Bestätigung dieser Annahme könnte durch den Vergleich der Absorptionen des Markierungsansatzes zu Beginn der Reaktion und nach mehrstündiger Inkubation erfolgen. Um hierbei einen wirklichen Effekt zu sehen, wäre ein Protein-Farbstoff-Verhältnis zu wählen, bei dem vorzugsweise der gesamte Farbstoff an das Protein bindet. Die erfolgreiche Markierung sollte zusätzlich nach der Aufreinigung biochemisch bestätigt werden.

Unter der Annahme, dass bei der Markierung von LHCP mit PDI-Mal, PDI-TE, DNQDI und TMIMA annähernd dieselben Markierungsausbeuten erreicht werden wie bei anderen Farbstoffen, lassen sich die tatsächlichen Extinktionskoeffizienten der an das Protein gebundenen Farbstoffe berechnen. Bei PDI-Mal wurde laut Absorption eine Ausbeute von 31% berechnet, die Trennung von PDI-S160Ch ergab dagegen eine Markierung von 85%. Demnach verringert sich der Extinktionskoeffizient um 63% und beträgt im Absorptionsmaximum nur noch rund $6000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Dieser Wert liegt sogar noch unter den $10.000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, die von Werwie (2009) angenommen wurden. Die analoge Überlegung führt bei PDI-TE zu einem Extinktionskoeffizienten am Absorptionsmaximum von rund $11.500\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, bei DNQDI von rund $35.000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ und bei TMIMA von rund $12.000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

Die Ergebnisse für TDI-Mal geben dagegen keinen Anlass, auch bei diesem Rylensfarbstoff von einer Verringerung des Extinktionskoeffizienten nach Bindung an LHCP auszugehen. Hier ergaben sich laut Absorption Markierungsausbeuten von annähernd 100%, wobei die Anwesenheit von ungebundenem Farbstoff in der Probe durch Gelelektrophorese ausgeschlossen werden konnte (vgl. III2.2). Zwar kommt es auch bei TDI-Mal zu einer Verringerung des Extinktionskoeffizienten bei der Funktionalisierung ($\epsilon_{\text{TDI-NF}} = 23.900 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Jung et al., 2006), $\epsilon_{\text{TDI-Mal}} = 16.600 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (Peneva et al., 2008a)). Diese beträgt aber nur rund 30% und ist somit geringer als bei PDI-Mal. Zusätzlich hat TDI-Mal von allen in dieser Arbeit verwendeten Rylenen die längste Kohlenstoffkette zwischen Maleimidgruppe und Rylensfarbstoff. Dieses könnte den Einfluss einer Reaktion am Maleimid auf das π -Elektronensystem verringern, und somit einer Veränderung der Absorptionseigenschaften entgegen wirken.

Es ist daher sinnvoll bei der Markierung von LHCII mit Rylensfarbstoffen die Markierungsausbeute immer auf mindestens zwei Wegen zu bestimmen, um eine mögliche Veränderung des Extinktionskoeffizienten zu bemerken. Außerdem erscheint eine möglichst lange Kohlenstoffkette zwischen funktionaler Gruppe und Farbstoff vorteilhaft. Die Tatsache, dass bei TDI-S3Ch ein effizienter Energietransfer beobachtet wurde (IV1.5.2), zeigt ferner, dass diese Kettenlänge den Energietransfer nicht negativ beeinflusst.

Abschließend bleibt noch die Frage zu klären, warum bei Hybridkomplexen aus LHCII und PDI-Farbstoffen kein Akzeptorzuwachs beobachtet werden konnte, denn der verringerte Extinktionskoeffizient bietet dabei keine ausreichende Erklärung (vgl. III1.1.2 und III3.1.3). Der laut gelöschter Donor-(PDI-)fluoreszenz erwartete LHCII-Fluoreszenzzuwachs ist groß genug, um in entsprechenden Fluoreszenzemissionsspektren deutlich sichtbar zu sein (Abb. 4.1.2 A). Bei der Bestimmung des Energietransfers werden die Spektren der Hybridkomplexe in die jeweiligen Einzelspektren der Komponenten zerlegt. Vergleicht man nun die Differenz zwischen dem Originalspektrum und der Summe der berechneten Einzelspektren erkennt man, dass sich dieser Fehler in derselben Größenordnung bewegt, wie der erwartete LHCII-Fluoreszenzzuwachs (Abb. 4.1.2 B). Es ist dadurch denkbar, dass PDI-LHCII-Hybridkomplexe durchaus einen Akzeptorzuwachs aufweisen, dieser aber sozusagen im Rauschen untergeht und dadurch nicht eindeutig nachgewiesen werden kann. In diesem Fall scheint es angebracht, die deutliche Löschung der Donorfluoreszenz als einzigen Nachweis für den erfolgreichen Energietransfer gelten zu lassen.

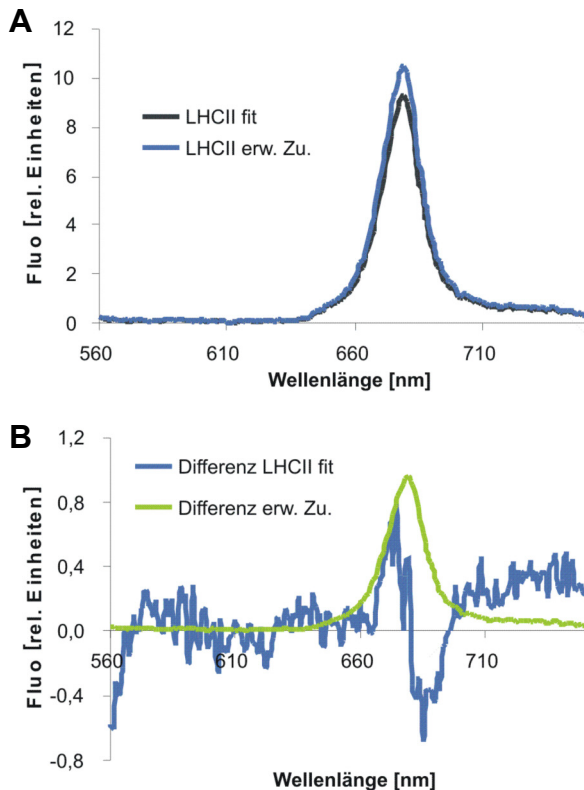


Abb. 4.1.2 LHCII-Fluoreszenzzuwachs in PDI-LHCII Hybridkomplexen.

A) Darstellung des erwarteten LHCII-Zuwachses (LHCII erw. Zu.) in PDI-S3Ch Hybridkomplexen im Vergleich zu der unstimulierten LHCII-Fluoreszenz (LHCII fit) in Fluoreszenzemissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 550 \text{ nm}$). Letztere wurde aus Summenspektren von Trypsin verdauten PDI-S3Ch Komplexen berechnet. B) Differenz der unter (A) dargestellten Spektren (Differenz erw. Zu.) und Differenz des Originalspektrums von Trypsin verdautem PDI-S3Ch und dem Summenspektrum der errechneten Einzelspektren (Differenz LHCII fit).

1.5.2 Verwendbarkeit von Akzeptor-Rylenfarbstoffen

Der LHCII fungiert in der Pflanze als Lichtantenne, die absorbierte Lichtenergie an das Reaktionszentrum als Endakzeptor weitergibt. In einem biomimetischen Modell könnte dasselbe Prinzip verwendet werden, wobei die Energie auf einen Akzeptorfarbstoff als Äquivalent des Reaktionszentrums übertragen wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher mehrere Rylenfarbstoffe auf ihre Tauglichkeit als Akzeptoren getestet.

Bei der Verwendung des Quaterrylenfarbstoffes DNQDI zeigte sich, dass der stark hydrophobe Charakter des Farbstoffes eine Verwendung mit dem LHCII problematisch werden lässt. Die Markierung des Proteins war zwar erfolgreich, jedoch konnte dieses anschließend nicht mehr durch SDS in Lösung gebracht werden, wodurch eine funktionelle Rekonstitution nach dem Standardrezept nicht möglich war (vgl. III2.1). Es wurde allerdings nicht ausprobiert, ob das markierte Protein durch GuHCl gelöst werden könnte. Eine solche Probe wäre möglicherweise durch die von Yang et al. (2003) vorgestellte Methode zu rekonstituieren, obwohl es durchaus denkbar ist, dass sich auch dabei durch den hydrophoben Farbstoff Probleme ergeben werden. Interessanterweise zeigt TMIMA ein ähnliches Löslichkeitsverhalten wie DNQDI, dennoch ist die Faltung des markierten LHCII nicht beeinträchtigt (III2.3.2). Die Anwesenheit des hydrophilen Carbonsäureanhydrids scheint auszureichen, um das Protein mit SDS lösen zu können. Dies bedeutet, dass Farbstoffe, mit denen der LHCII markiert werden soll, nicht notwendigerweise wasserlöslich sein müssen. Es genügt, wenn sie einige hydrophilere Gruppen besitzen, bzw. zumindest nicht nur Alkylketten als Substituenten aufweisen.

Gerade bei größeren Rylene Farbstoffen tritt im Zusammenhang mit hydrophilen Resten häufig eine verminderte Fluoreszenzquantenausbeute auf. So fluoresziert das wasserlösliche TDI-Mal in Wasser überhaupt nicht (Peneva et al., 2008a). Auch bei dem Versuch einen weniger hydrophoben Quaterrylenfarbstoff zu synthetisieren, konnte dieses Problem beobachtet werden (persönliche Mitteilung Yuri Avlasevich). Dies erscheint aber im Vergleich zur Hydrophobizität vernachlässigbar zu sein. Zum einen kann in der Regel durch die Verwendung von Detergentien eine gesteigerte Fluoreszenz dieser Farbstoffe beobachtet werden (Tang et al., 2007) und diese sind bei Versuchen mit dem LHCII obligatorisch. Zum anderen erleichtert eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute zwar die Analyse der Hybridkomplexe, allerdings reicht auch eine minimale Fluoreszenz, um wie bei TDI-S3Ch einen Energietransfer nachweisen zu können.

Tabelle IV.2 Försterradien (R_0) von TDI-Mal und LHCII.

Neben den Försterradien des Hin- und Rücktransfer sind außerdem die erwarteten Energietransfereffizienzen für die theoretischen Abstände zwischen Donor und Akzeptor von 2 und 4 nm angegeben.

	R_0 [Å]			Erwarteter Energietransfer [%] Abstand 2 nm / 4 nm		
	Chl a	Chl b	LHCII	Chl a	Chl b	LHCII
LHCII → TDI-Mal	42,9	39,6	42,2	98,9 / 60,3	98,4 / 48,5	98,9 / 58,0
TDI-Mal → LHCII	31,8	28,2	49,2	94,2 / 20,2	88,7 / 11,0	99,5 / 77,6

Die Untersuchungen von TDI-S3Ch Hybridkomplexen weisen allerdings ein anderes Problem auf. Hier konnte zwar ein Energietransfer von LHCII auf TDI-Mal beobachtet werden, allerdings erfolgt dieser nur mit einer Effizienz von 24%. Ein ähnliches Phänomen wurde auch bei BTI-LHCII Komplexen beobachtet und mit einem möglichen Energie“rück“transfer vom Farbstoff auf den LHCII erklärt (Wolf-Klein et al., 2002). Die Absorptions- und Fluoreszenzmaxima von BTI sind langwelliger als bei TDI-Mal, wodurch dieser Effekt bei TDI-Mal sogar noch denkbarer erscheint (BTI: $E_{x_{\max}} = 701$ nm, $E_{m_{\max}} = 735$ nm, Wolf-Klein, 2001; TDI-Mal $E_{x_{\max}} = 677$ nm, $E_{m_{\max}} = 695$ nm). Die Berechnung der Försterradien für den Energietransfer von LHCII auf den Farbstoff, bzw. vom Farbstoff auf den LHCII bestätigt diese Möglichkeit. Die Werte für den Rücktransfer von TDI-Mal auf Chl a bzw. Chl b sind zwar rund 10 Å geringer als für den Hintransfer, jedoch ergibt sich hier bei einem theoretischen Abstand zwischen Farbstoff und Chlorophyll von 4 nm immer noch ein Energietransfer von rund 10 bzw. 20% (Tabelle IV.2). Der tatsächliche Abstand zwischen dem Farbstoff und den Chlorophyllen kann zwar nicht bestimmt werden, da die Lage der Markierungsposition an der dritten Aminosäure in Strukturdaten des LHCII bisher nicht aufgeklärt ist (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005), Einzelmolekülspektroskopische

Untersuchungen zeigen jedoch, dass der Abstand nicht über 4 nm liegt (Boggasch, 2006). Betrachtet man zusätzlich alle Chlorophylle im LHCII als mögliche Energieakzeptoren und berechnet somit den Försterradius von TDI-Mal auf LHCII, ist dieser für den Rücktransfer sogar größer als für den gewünschten Transfer von LHCII auf TDI-Mal.

Terrylenfarbstoffe kommen demnach als alleinige Akzeptoren der LHCII-Anregungsenergie nicht in Frage, vielmehr ist hier immer ein Energietranfer in beide Richtungen zu beobachten. Es wäre jedoch denkbar, solche Hybridkomplexe z.B. als Lichtsammler und/oder Elektroneninjektoren in sogenannten „Dye-sensitised solar cells“ (DSSCs) nach dem von O'Regan und Grätzel vorgestellten Prinzip zu verwenden (O'Regan & Grätzel, 1991), wobei die Anwesenheit des TiO_2 als Endakzeptor das Gleichgewicht des Energietransfers auf Seiten des Terrylenfarbstoffs verschieben sollte. Quaterrylenfarbstoffe sind dagegen durch ihre spektralen Eigenschaften durchaus als potente Energieakzeptoren für den LHCII denkbar. Es bedarf hier aber eines Farbstoffes der hydrophilere Eigenschaften besitzt, als das in dieser Arbeit verwendete DNQDI.

1.5.3 Nutzung von TMIMA-LHCII in DSSCs

In DSSCs dienen Farbstoffe zur verbesserten Lichtabsorption, wobei die absorbierte Energie durch Ladungstrennung elektrisch nutzbar gemacht wird (O'Regan & Grätzel, 1991). Bei der Verwendung von Terrylen-LHCII-Hybridkomplexen wird diese Aufgabe sozusagen von den beiden Komponenten geteilt. Der LHCII würde seine physiologische Aufgabe als Lichtantenne wahrnehmen, diese Energie auf den Terrylenfarbstoff übertragen, welcher wiederum die Elektronen an das TiO_2 abgeben würde. Die Idee, durch die Verwendung verschiedener Farbstoffe die Absorption der Solarzellen zu verbessern, wobei nur ein Farbstoff als Elektroneninjektor fungiert und der andere seine Energie durch FRET überträgt, ist vom Prinzip her den Mechanismen in der Photosynthese sehr ähnlich und wurde auch schon in DSSCs verwendet (Odobel & Zabari, 2005; Siegers et al., 2008). Hier fungieren jeweils unterschiedliche Farbstoffe als Antenne, welche die Energie über FRET auf einen Ru(III/II) -Komplex übertragen. Die Verwendung von LHCII erweiterte diese Anwendung um die Tatsache, dass die lichtammelnden Farbstoffe in einem Pigment-Protein-Komplex vorliegen. In unserer Arbeitsgruppe wurden im Rahmen der Dissertationen von Wolf-Klein und Lion schon entsprechende Ansätze untersucht (Wolf-Klein, 2001; Lion, 2005).

Hybridkomplexe aus TDI-Mal und LHCII kommen für die Belegung von TiO_2 -Platten nicht in Frage. Die Metalloberfläche ist negativ geladen (Topoglidis et al., 2001), daher würde der Farbstoff mit seinen ebenfalls vier negativ geladenen Sulfonsäureresten nur schlecht auf der Oberfläche binden. Stattdessen wurde der Terrylenfarbstoff TMIMA verwendet, der ein Carbonsäureanhydrid besitzt. Dieses öffnet sich bei der Bindung an TiO_2 -Partikel, wobei

zwei Carboxylgruppen entstehen, die über starke hydrophile Wechselwirkungen mit der Oberfläche interagieren (Kay & Grätzel, 1993). Zusätzlich wurde die Tauglichkeit des Farbstoffes ohne Maleimidgruppe in DSSCs schon gezeigt (Edvinsson et al., 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Belegung der Platten mit TMIMA und LHCII anhand von zwei Strategien versucht. Zum einen wurde LHCP mit TMIMA markiert und anschließend rekonstituiert. Die so gewonnen Hybridkomplexen wurden dann mit TiO_2 -Platten inkubiert. Zum anderen erfolgte die Belegung der Platten zuerst mit dem Farbstoff. Anschließend sollte rekonstituierter LHCII mit dem Farbstoff interagieren und auf diese Weise an die Platten binden. In keinem der Versuche konnte jedoch eine spezifische LHCII-Bindung beobachtet werden (vgl. III.2.3.3). Es befand sich zwar LHCII auf den Platten, die Belegungsichte war jedoch zu gering, um damit weiterführende Versuche anzugehen. Die Ursachen für dieses Problem sind für jede der zwei Strategien vermutlich unterschiedlich. In TMIMA-S3Ch Hybridkomplexen waren möglicherweise nur wenige LHCII-Moleküle mit TMIMA markiert, wodurch auch nur eine geringe Anzahl an Bindungen zwischen Farbstoff und TiO_2 zustande kommen konnte. Die Strategie, die Platten erst mit dem Farbstoff zu belegen und anschließend den LHCII daran zu binden, würde dieses Problem lösen. Allerdings scheinen bei diesen Versuche die zeitlichen Abstände zwischen Farbstoff- und LHCII-Belegung zu groß gewesen zu sein. In der Zwischenzeit hatten vermutlich die meisten der Maleimidgruppen schon mit Luftsauerstoff reagiert und waren somit nicht zu einer Bindung mit LHCII fähig. Um dies zu umgehen, sollte in folgenden Versuchen darauf geachtet werden, dass die Belegung mit dem Farbstoff möglichst an demselben Tag erfolgt wie die anschließende Inkubation mit LHCII. Dieses könnte schon eine höhere LHCII-Bindung zur Folge haben.

Als weitere Möglichkeit könnte versucht werden, LHCII und TMIMA unabhängig voneinander an die Oberfläche zu binden. Bei den hier verwendeten TiO_2 -Platten war jedoch die Belegungsichte von LHCII viel geringer als von Farbstoff, was zu einem ungünstigen Verhältnis der beiden Stoffe auf der Platte führen würde. Die Belegungsichte hängt maßgeblich vom TiO_2 ab. Die Verwendung von TiO_2 -Partikeln vergrößert die aktive Oberfläche um ein Vielfaches. So gaben Nazeeruddin et al. (1993) an, dass bei TiO_2 -Partikel mit einem Durchmesser von 15-30 nm und 8-12 μm Schichtdicke die Oberfläche rund dem tausendfachen der planaren Fläche entspricht. Diese ist aber nur nutzbar, wenn die entsprechenden Farbstoff- oder Proteinmoleküle in die tieferen Schichten gelangen. Lion (2001) gab an, dass trimerer LHCII ungefähr einen Flächenbedarf von 34,5 nm^2 besitzt. Die von ihm verwendeten TiO_2 -Partikel hatten einen durchschnittlichen Durchmesser von rund 21 nm, wodurch es LHCII-Trimeren nicht gelingen dürfte, im Gegensatz zu kleineren Farbstoffmolekülen, in tiefere Schichten vorzudringen (Lion, 2005). In der hier vorliegenden Arbeit waren die TiO_2 -Partikel sogar noch kleiner, worin die geringe Belegungsichte ihre

Ursache haben könnte. Für eine bessere Bindung des LHCII an TiO_2 sollten also im Folgenden Partikel von mindestens 100-200 nm Anwendung finden. Solche Partikel haben zusätzlich den Vorteil, dass dadurch die Lichtstreuung innerhalb der TiO_2 -Schicht vermehrt wird und die dadurch erhöhte Lichtabsorption effizientere DSSCs entstehen lässt (Chen et al., 2009). Zusätzlich könnten Peptidsequenzen mit spezifischen Bindungsaffinitäten zu TiO_2 -Oberflächen an den LHCII gehängt werden (vgl. Chen et al., 2008). Es ist aber darauf zu achten, die von Lion (2005) postulierte Konkurrenz von LHCII und Farbstoffen um Bindungsplätze auf der Oberfläche zu vermeiden.

Obwohl es Hinweise für einen erfolgreichen Energietransfer von LHCII auf TMIMA gibt, spricht die starke Verschiebung der Absorptions- und Fluoreszenzmaxima nach der Ringöffnung des Carbonsäureanhydrids gegen die weitere Verwendung von TMIMA als Farbstoff in solchen Konstrukten, da hierdurch die Effizienz des Transfer stark reduziert sein dürfte. Ein Farbstoff mit langwelligeren spektralen Eigenschaften ist demnach zu bevorzugen.

1.6 „Neue“ Farbstoff-LHCII-Interaktionen

Für weiterführende Versuche mit Hybridkomplexen aus LHCII und Fluoreszenzfarbstoffen ist eine große Vielfalt an möglichen Interaktionen von Vorteil. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit zum einen das Prinzip der nativen chemischen Ligation auf eine Markierung des LHCII übertragen, zum anderen wurde die Interaktion mit einem NTA-Farbstoff untersucht. Beide Reaktionen stellen dabei prinzipiell etablierte Methoden dar, die hier aber in einem selteneren Kontext angewendet wurden.

1.6.1 „Native chemische Ligation“ mit dem LHCII

Die native chemische Ligation findet zumeist in der Peptidsynthese Anwendung, wobei die Ausbildung einer natürlichen Peptidbindung und die einfachen Reaktionsbedingungen für diese Methode sprechen (Dawson et al., 1994). In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Prinzip für die Reaktion eines LHCII mit N-terminalem Cystein und dem Fluoreszenzfarbstoff PDI-TE angewandt. Bei der rekombinanten Proteingewinnung ist die Herstellung eines Proteins mit N-terminalem Cystein nur indirekt zu gewährleisten, da hier für die Initiation der Translation ein Methionin an erster Stelle benötigt wird. Häufig werden daher rekombinante Proteine mit spezifischen Schnittstellen vor einem Cystein versehen, um durch den Verdau mit der entsprechenden Protease ein N-terminales Cystein zu erhalten und das so prozessierte Protein in einer nativen chemischen Ligation einsetzen zu können (Review Dawson & Kent, 2000). Bei vielen *E.coli*-Proteinen findet man allerdings im murenen Zustand

kein Methionin an erster Stelle. Dieses wird vermutlich co-translational in Abhängigkeit von der folgenden Aminosäure durch die Methionylaminopeptidase abgespalten (Hirel et al., 1989). Befindet sich ein Cystein, und damit eine relativ kleine Aminosäure, an der zweiten Position werden laut der Studie 70% der Proteine prozessiert, wobei auf diese Weise mehr oder weniger direkt Proteine mit N-terminalem Cystein hergestellt werden können. In der hier vorliegenden Arbeit wurde nun die Aktivität der Peptidase in verschiedenen *E.coli*-Stämmen mit derselben Aminosäuresequenz untersucht (III.3.1.1). Während bei der Expression in JM101-Zellen nur noch 25% der LHCP mit Methionin begannen und somit ähnliche Werte wie bei Hirel et al. (1989) erreicht wurden, lagen bei BL21-Zellen die Werte mit 50% deutlich höher. Interessanterweise wurde für den *E.coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS in anderen Studien eine 100%ige Methionin-Abspaltung postuliert (Gentle et al., 2004). Die geringere Prozessierung des LHCP könnte daran liegen, dass sich hier ein Lysin an dritter Stelle befindet. Gentle et al. (2004) messen dieser Position zwar nur bei einer weiterführenden Prozessierung eine Bedeutung zu, jedoch befindet sich in keinem der von ihnen untersuchten Peptide dort ein Lysin, womit eine Beeinflussung der Methionin-Abspaltung nicht ausgeschlossen werden kann.

Bei der Expression von Proteinen mit N-terminalem Cystein ergibt sich neben der Prozessierung auch das Problem der Reaktivität dieser Gruppe. Es wurde daher in dieser Arbeit das von Gentle et al. (2004) vorgestellte Protokoll für die Überexpression von Proteinen mit N-terminalem Cystein verwendet, wobei durch die Verwendung von freiem Cystein und MMTS unerwünschte Nebenreaktionen des N-terminalen Cystein ausgeschlossen werden sollen (vgl. II.6.3.5). Es zeigte sich, dass dies trotz einer verminderten LHCP-Expression durchaus sinnvoll ist, da sich bei der Verwendung von standardmäßig überexprimiertem LHCP geringere Markierungsausbeuten ergaben (Abb. 3.3.3). LHCP aus BL21-Stämmen wurde aufgrund der geringen Methionin-Abspaltung nicht weiter verwendet. Hier sollte jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Aufreinigung der IBs bei Lysaten aus diesen Bakterienstämmen nicht ausreichend war und sich noch viele bakterielle Proteine in den Proben befanden (Abb. 3.3.1). Sollte daher die Verwendung dieser *E.coli*-Stämme in anderen Experimenten für eine LHCP-Überexpression in Betracht gezogen werden, muss das Aufreinigungsprotokoll entsprechend angepasst werden.

Die Markierungsausbeuten bei der Reaktion von PDI-TE mit R1Ch lagen nie über 45%. Zwar konnte eine Erhöhung der Proteinkonzentration durch Verwendung von 8 M GuHCl sowie der Farbstoffkonzentration durch einen 5fach molaren Überschuss die Markierung analog zu IV.1.1.1 verbessern, jedoch wird allgemein die Vollständigkeit der Reaktion angenommen (vgl. III.3.1.3). In Markierungsversuchen von Cy5.5 mit synthetischen Peptiden lag dagegen die Ausbeute bei 2 mM Protein auch nur bei 68% (Schuler & Pannell, 2002). Bedenkt man, dass bei den hier verwendeten LHCP-Proben aufgrund der unvollständigen

Methionin-Abspaltung 75% einer maximalen Markierung entsprechen würde, liegen die erhalten Markierungsausbeuten von 45% in demselben Rahmen (rund 60%). Es ist nicht auszuschließen, dass trotz des veränderten Expressionsprotokolls einige Cysteine durch Reaktionen mit unerwünschten Partnern geblockt waren und/oder das Protein noch weiter prozessiert wurde. Obwohl mit Lysin eine vergleichsweise große Aminosäure nach dem Cystein folgt, und somit laut Gentle et al. (2004) keine Cystein-Abspaltung zu erwarten ist, konnte mit der verwendeten Methode keine Aussage über eine weitere N-terminale Prozessierung gemacht werden. Beides wären mögliche Erklärungen für eine unvollständige Markierung.

Das Prinzip der nativen chemischen Ligation konnte hier trotz der geringen Markierungsausbeuten erfolgreich auf die Interaktion von LHCII mit PDI-R1Ch übertragen werden, wobei diese Markierungsmethode eine interessante Alternative zu den etablierten Reaktionen mit Maleimid- und NHS-Farbstoffen bietet. Neben dem geringen Farbstoff-Aufwand ist hier vor allem die Spezifität der Reaktion hervorzuheben. Weitere in dem Protein vorhandene Cysteine können nicht mit dem Thioester-Farbstoff reagieren, wodurch nur eine einzige Markierung am N-Terminus möglich ist. Außerdem konnte hier, analog zu den anderen Markierungsmethoden, kein negativer Einfluss auf die Struktur des LHCII beobachtet werden (III.3.1.3). Im Sinne der üblichen Verwendung der nativen chemischen Ligation könnte der LHCII durch diese Methode auch mit Peptiden, die z.B. besondere Affinitäten für spezifische Metalloberflächen besitzen, fusioniert werden, ohne dass es einer Mutagenese bedarf. Diese Reaktion müsste zwar vermutlich am denaturierten Protein erfolgen, da die Anwesenheit von GuHCl für die Reaktion wichtig ist (Schuler & Pannell, 2002). Es konnte allerdings in anderen Versuchen, bei denen sich die reagierenden Termini z.B. durch Proteinfaltung räumlich sehr nahe kamen, auch ohne GuHCl eine Ligation zweier Peptide erreicht werden (Beligere & Dawson, 1999), wodurch auch die Möglichkeit den gefalteten LHCII zu fusionieren nicht vollständig ausgeschlossen werden kann.

Durch das veränderte apparente Molekulargewicht des markierten R1Ch konnte in den hier durchgeführten Versuchen das Protein durch präparative Gelelektrophorese aufgereinigt werden, wodurch die Verunreinigung der Probe mit nicht markiertem Protein und freiem Farbstoff in der weiteren Verwendung der Hybridkomplexe kein Problem darstellte (Abb. 3.3.4). Sollte dies bei anderen Anwendungen der nativen chemischen Ligation mit R1Ch nicht durchführbar sein, ergibt sich die Möglichkeit, Proteine ohne N-terminalem Cystein schon vor der Markierung über eine Affinitätschromatographie mit Aldehyden als interagierende Gruppe zu entfernen (Villain et al., 2001). Dadurch sollte die Markierungsausbeute deutlich erhöht werden. Zusätzlich könnte nach der Markierung eine

Aufreinigung bezüglich der freien N-terminalen Aminogruppe bei unmarkierten Proteinen erfolgen, um so reine markierte Proteine zu erhalten.

1.6.2 Detektion von „His-Tag“-Proteinen durch PDI-NTA

Die schnellste Methode, um trimeren LHCII herzustellen, beinhaltet die Affinitätschromatographie der monomeren Pigment-Proteine-Komplexe an der Ni-Säule, wobei die Proteine durch ihren „His-Tag“ an das Ni-NTA des Säulenmaterials binden. Aus diesem Grund haben die meisten LHCII-Klone einen „His-Tag“. Auch viele andere rekombinant hergestellte Proteine werden mit einem ebensolchen ausgestattet, da sich dadurch die Aufreinigung des Wunschproteins schnell realisieren lässt. Zusätzlich kann der „His-Tag“ dazu genutzt werden, das Protein über Western Blot-Analysen zu identifizieren, wobei „His-Tag“-spezifische Antikörper verwendet werden. Diese Vorgehensweise ist aber relativ zeitaufwendig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob man einen solchen Nachweis auch im PA-Gel über einen Fluoreszenzfarbstoff mit NTA als aktiver Gruppe realisieren kann.

Die Inkubation von verschiedenen LHCII-Klonen nach Auftrennung durch SDS-PAGE mit PDI-NTA ergab ein Signal auf Höhe der Proteine, wobei dieses je nach Klon und pH unterschiedlich stark ausfiel (Abb. 3.3.5). Es ist allerdings erstaunlich, dass auch bei D7f3, einer LHCII-Mutante ohne „His-Tag“, ein Signal zu beobachten war. Dieser Klon besitzt zwar drei Histidine, diese sind aber weit voneinander entfernt und eine Interaktion mit PDI-NTA sollte nicht auftreten. Im Gegensatz dazu ist es durchaus denkbar, dass die Proteine im Marker auch rekombinant mit einem „His-Tag“ versehen wurde und deshalb mit PDI-NTA interagieren. Dennoch ist dies für eine einwandfreie Detektion von „His-Tag“-Proteinen in PA-Gelen ebenso störend, wie die Schwierigkeit den optimalen Zeitpunkt für die Analyse zu finden. Es ist somit zwar möglich mit PDI-NTA „His-Tag“-Proteine im PA-Gel sichtbar zu machen. Diese Interaktion scheint aber nicht spezifisch genug, um z.B. ein „His-Tag“-Protein in der Proteinviefalt eines Gesamtzellextrakts eindeutig nachzuweisen.

Die Tatsache, dass in den Messungen eher eine „Absorption“ von PDI-NTA beobachtet wurde, ist zwar durchaus interessant, dies wäre aber keine Behinderung bei der Detektion von „His-Tag“-Proteinen. Die Ursache für dieses Phänomen könnte in einer starken Fluoreszenzlöschung des Farbstoffes liegen. Bei vielen NTA-Farbstoffen wird nach der Komplexbildung mit Ni^{2+} -Ionen eine Verringerung der Fluoreszenzquantenausbeute beobachtet. Bei Cy3- bzw. Cy5-NTA beträgt diese rund 75% (Kapanidis et al., 2001), bei NTA-funktionalisierten Orange Green 488, Atto 565 und FEW S0387 50-80% (Lata et al., 2006). Allerdings trifft dieses Phänomen nicht auf PDI-NTA zu (Peneva et al., 2008b). In der Regel ist außerdem auch keine Verringerung der Fluoreszenzquantenausbeute durch die

Interaktion mit Proteinen zu beobachten. Im Gegenteil liefern spezifische Protein-Farbstoff-Interaktionen mit Fluorescein-NTA deutliche Fluoreszenzsignale (Goldsmith et al., 2006). Bei der Interaktion mit Proteinen in PA-Gelen ist allerdings ein Unterschied zu verzeichnen. Hier befinden sich sehr viel mehr interagierende Proteine auf engem Raum. Es ist daher durchaus vorstellbar, dass sich dadurch die PDI-Moleküle, vergleichbar mit der Fluoreszenzlöschung in Chlorophyll-Aggregaten (Beddard & Porter, 1976), gegenseitig quenchen und somit nicht ein „Fluoreszenz“- sondern ein nur ein „Absorptions“-Signal gemessen werden kann.

Über die generelle Detektion von „His-Tag“-Proteinen in PA-Gelen hinaus, lässt sich durch die hier durchgeführten Versuche auch ein Einblick in die Interaktion unterschiedlicher „His-Tags“ am LHCII mit NTA gewinnen. Es zeigt sich, dass analog zu den Annahmen von Dockter (2009) tatsächlich die Interaktion bei pH 7,5 geringer ausfällt als bei 8,5. Dies ist wohl auf die Protonierung einzelner Histidine zurückzuführen, wodurch die Komplexbildung gestört wird. Die Deutlichkeit der schlechteren Interaktion ist angesichts eines pK von 6 für Histidin (Berg et al., 2003) allerdings interessant und bestätigt den Einfluss benachbarter Aminosäuren und des Lösungsmittels auf den tatsächlichen Protonierungsgrad (vgl. IV1.2.1). Außerdem wird deutlich, dass die Interaktion eines N-terminalen „His-Tags“ stärker ausgeprägt ist, als bei einem gleich langen C-terminalen „His-Tag“. Diese Erkenntnisse könnten z.B. bei der Herstellung heterogener LHCII-Trimere von Nutzen sein (vgl. Dockter, 2009).

2 Hybridkomplexe aus Quantum Dots und LHCII

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der LHCII außer mit Farbstoffen auch mit QDs zu Hybridkomplexen verbunden. Während die Komplexe mit Farbstoffen auf gezielte Fragestellungen hin untersucht werden konnten, mussten für die Verwendung von Hybridkomplexen aus QDs und LHCII noch grundlegende Fragen beantwortet werden. Hierzu gehörte neben dem Verhalten von QDs in der wässrigen Umgebung des LHCII auch der molekulare Mechanismus, mit dem die beiden Materialien interagieren. Für eine mögliche weitere Verwendung von QD-LHCII-Hybridkomplexen war zusätzlich die Untersuchung eines möglichen Energietransfers von Bedeutung.

2.1 ZnS-Bindungsmutanten

Auf der Suche nach einer optimalen Bindung von LHCII an QDs wurden in dieser Arbeit Fusionsproteine aus LHCII und ZnS-bindenden Sequenzen hergestellt. Die entsprechenden ZnS-bindenden Sequenzen, publiziert nach „Phage-Display“-Analysen von Flynn et al. (2003), wurden N- bzw. C-terminal an den LHCII-Klon C79S gehängt. Die Mutagenese erfolgte dabei durch PCR, wobei diese gerade bei den N-terminalen Mutanten erst nach mehreren Versuchen erfolgreich war und ein PCR-Produkt in ausreichenden Mengen detektiert werden konnte (vgl. III.6.1.1). Der Schlüssel zum Erfolg lag dabei in einer deutlich erhöhten Menge an Ausgangs-DNA. Dieses bedeutet in der Regel, dass die Anlagerung der Primer an das Plasmid nicht optimal funktioniert. Dabei schien die „Annealing“-Temperatur keinen ausreichenden Einfluss zu haben, da sie über einen weiten Temperaturbereich getestet worden war und dennoch bei geringen Plasmidmengen kein PCR-Produkt erhalten wurde. Bei der Auswahl der bindenden Sequenzen für die beiden N-terminalen ZnS-Bindungsmutanten war es sehr schwierig, aufeinander passende Eigenschaften (GC-Gehalt und Schmelzpunkt) für den „forward“- und „reverse“-Primer zu finden. Allerdings ergaben sich aufgrund der angestrebten Lage der ZnS-Bindungssequenzen, als „Inserts“ zu Beginn der codierenden Sequenz, wenig Alternativen, und es mussten Sequenzen gewählt werden, die nicht optimal abgestimmt waren. Dieses Problem trat bei der C-terminalen Mutation nicht auf, weshalb hier auch die PCR vermutlich schneller erfolgreich war. Die Problematik lag also nicht an den zu inserierenden Sequenzen, sondern an dem Ort der Insertion. Es ist davon auszugehen, dass die gewählte Klonierungsstrategie demnach im Allgemeinen sehr effektiv ist und nur bei den hier hergestellten N-terminalen Mutanten an ihre Grenzen stößt. Für weitere N-terminale Insertions-/ Fusionsmutanten sollte daher eine alternative Methode gewählt werden.

Trotz des allgemeinen Erfolgs der Klonierungsstrategie bleibt außerdem noch festzuhalten, dass bei einem hohen Prozentsatz der veränderten Plasmide ein

Nukleotidaustausch zu verzeichnen war, der nicht der gewünschten Sequenz entsprach. Dies liegt vermutlich an der Länge der eingefügten und damit nicht bindenden Nukleotide. Hier wurden 36 bzw. 45 Nukleotide inseriert und es ist vorstellbar, dass dies der Obergrenze der durch diese Methode zu inserierenden Nukleotide entspricht. Außerdem wird klar, dass nach der Mutagenese immer eine Sequenzierung des endgültigen Plasmides erfolgen sollte, um mögliche, ungewollte Veränderungen zu detektieren.

Durch die schließlich erfolgreiche Mutagenese ergaben sich drei neue LHCII-Klone, die jeweils eine um 12 bzw. 15 Aminosäuren verlängerte Sequenz aufweisen. Diese konnten ohne Probleme rekonstituiert und trimerisiert werden und zeigten im Vergleich zum Ausgangsklon keine spektralen Veränderungen (vgl. III.6.1.2). Es ist daher davon auszugehen, dass die Struktur der erhaltenen Pigment-Protein-Komplexe, abgesehen von den N- bzw. C-terminalen Anhängen, denen des wildtypischen LHCII entspricht. Dies ist nicht unerwartet, denn auch andere Sequenzverlängerungen haben sich nicht auf die Faltung ausgewirkt. So ist zum einen der „His-Tag“ zu nennen, der mit bis zu 12 Histidinen weder N- noch C-terminal die Faltung des LHCII stört (Kosemund et al., 2000; Plunger, 2007). Aber auch die N-terminale Fusion mit 13 Aminosäuren, die silikatifällende Eigenschaften haben, behinderte die Ausbildung des Pigment-Protein-Komplexes nicht (Roos, 2008; Oehls, 2009). Der LHCII konnte sogar mit einem zweiten Protein, dem „Green fluorescent protein“, verbunden werden und die Faltung wurde nicht erschwert (Kosemund et al., 2000). Auch ein zusätzlich zum „Green fluorescent protein“ eingefügter „His-Tag“ hatte keine Auswirkungen (Boggasch, 2006). Alle verwendeten Sequenzen waren hydrophil und es ist daher davon auszugehen, dass sie nicht mit dem LHCII um Platz in der Detergenzmizelle konkurrieren, sondern in die wässrige Umgebung zeigen. Dadurch wird die native Struktur nicht beeinflusst und es ist zu erwarten, dass auf diese Weise viele verschiedene Sequenzen an den LHCII gehängt werden können, ohne dass seine Fähigkeit, einen Pigment-Protein-Komplex auszubilden, beeinflusst wird.

2.2 Verhalten der verwendeten QDs in wässriger Lösung

Für Untersuchungen mit QD-LHCII-Hybridkomplexen ist es wichtig, dass die jeweiligen Einzelkomponenten stabile spektrale Eigenschaften besitzen, um Veränderungen in den Hybridkomplexen eindeutig zuweisen zu können. Dass eine solche Stabilität bei QDs nicht unbedingt gegeben ist, wurde schon von Eck (2009) beobachtet und diskutiert. Dennoch soll die Diskussion hier noch einmal aufgegriffen und durch die erweiterte Datenlage erneut betrachtet werden.

Im Gegensatz zu Proteinen und Farbstoffen entstehen bei der Synthese von QDs nicht hundertprozentig gleiche Komplexe. Diese Unterschiede liegen zwar in einem engen

Rahmen, führen aber z.B. bei der Synthese von CdSe-QDs mit einem mittleren Durchmesser von 2,9 nm zu Schwankungen von bis zu 0,65 nm (Breus et al., 2007). Trotz einer homogenen Verteilung in der Probe ist es vorstellbar, dass bei Verdünnungen von Aliquots geringfügig unterschiedliche QDs zum Einsatz kommen und somit Schwankungen in den spektralen Eigenschaften, wie in Abschnitt III4.2 beobachtet, wenigstens teilweise begründet werden können. Auch bei zwei unabhängig voneinander durchgeführten Synthesen kommt es zu geringfügigen Unterschieden zwischen den QDs. Diese können anhand der berechneten QD-Löschungskonstanten indirekt beobachtet werden (III5.1.1). Die Fluoreszenz beider Chargen wird zwar durch C3.2h stärker gelöscht als durch D7f3, dennoch ist der tatsächliche Wert für C3.2h bei der zweiten Charge um rund ein Viertel niedriger. Es kann also nicht davon ausgegangen werden, dass die Daten von QDs verschiedener Chargen immer im selben Rahmen liegen und somit zusammen analysiert werden können. Vielmehr machen diese Versuche deutlich, dass der Einsatz einer neuen Charge auch immer einen komplett neuen Datensatz erfordert.

Zusätzlich zu synthesebedingten Unterschieden in den QDs ergab sich bei den hier durchgeführten Versuchen das Problem, dass in einer wässrigen Umgebung gearbeitet werden musste. Allerdings sind QDs *per se* nicht wasserlöslich, sondern es bedarf Liganden, die mit der QD-Oberfläche interagieren und die Wasserlöslichkeit vermitteln. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Thiol-Liganden verwendet. Sulfhydrylgruppen besitzen eine Metallaffinität und binden somit an die Zinkionen der QD-Hülle (Algar & Krull, 2007). Besitzen die Liganden weitere hydrophile Gruppen, wird durch ihre Bindung auch der QD wasserlöslich. Dieses Prinzip wurde erstmals von Chan et al. (1998) benutzt, wobei β -ME als Ligand verwendet wurde. In der hier vorliegenden Arbeit kamen Liponsäure (DHLLA) und D-Penicillamin (DPA) zum Einsatz. Bei beiden Liganden entstand allerdings nach einiger Zeit ein Niederschlag in der Lösung, wobei dieser bei QDs mit DPA schneller auftrat, als bei DHLLA-QDs (III4.2). Dies hängt vermutlich mit der Anzahl der Thiolgruppen pro Ligand zusammen. Werden die Thiole oxidiert, können sie nicht mehr an den QD binden, sie diffundieren ab und als Folge aggregiert und pelletiert der QD (Aldana et al., 2001). Bei DPA tritt dieser Effekt nun womöglich schneller auf, da es im Gegensatz zu DHLLA nur eine Sulfhydrylgruppe besitzt. Hier verlieren die QDs bei einem einzigen Oxidationsereignis gleich zwei Liganden.

In Verdünnungen wird dieser Prozess noch verstärkt, denn in der Stammlösung der QDs befinden sich jeweils noch überschüssige und daher ungebundene Liganden. Sie können auf der QD-Oberfläche oxidiert werden und somit einer Aggregation entgegenwirken (Aldana et al., 2001). Durch die Verdünnung von Aliquots in QD-Saccharosepuffer werden jedoch auch die freien Liganden verdünnt und es kommt schneller zu einer QD-Aggregation. Aggregierte QDs fluoreszieren deutlich schlechter als monodisperse QDs (Algar & Krull,

2007), wodurch auch die größere Streuung der Fluoreszenzintensitäten von verdünnten DPA-QDs im Vergleich zu DHLA-QDs zu erklären ist (vgl. Abb. 3.4.2).

Für den Prozess der QD-Aggregation reicht es nicht, dass einige wenige Liganden von der Oberfläche abdiffundieren. Vielmehr ist es ein plötzlicher Effekt, der eintritt, wenn die Menge an gebundenen Liganden nicht mehr ausreicht, um die Wasserlöslichkeit zu vermitteln (Aldana et al., 2001). Es ist somit denkbar, dass abhängig vom Alter der eingesetzten QDs, die Menge der gebundenen Liganden abnimmt und sie dadurch unterschiedliche LHCII-bindende Eigenschaften aufweisen. Dadurch könnte der Unterschied in der Bindung von D7f3-Trimeren im Vergleich zu C3.2h-Trimeren bei 6xZnS-QDs und Multishell-QDs, die beide DHLA als Ligand besaßen, erklärt werden (Abb. 3.6.7 und Abb. 3.6.9, vgl. IV2.3.1).

Das entscheidende Problem der QD-Fluoreszenzstabilität in wässriger Lösung scheint somit die Oxidation der Liganden zu sein. Der Versuch, die A7-N-Bindung in An- und Abwesenheit von DTT zu untersuchen, gibt dabei einen Lösungsvorschlag (vgl. Abb. 3.6.8). Hier konnte zwar keine unterschiedliche LHCII-Bindung festgestellt werden, jedoch fiel eine deutlich gesteigerte QD-Fluoreszenz auf. Diese ist möglicherweise auf eine verminderte QD-Aggregation zurückzuführen. Es ist denkbar, dass das Reduktionsmittel DTT oxidierte DHLA-Moleküle reduziert hat, diese somit wieder an den QD binden konnten und ihn von einer Aggregation abhielten. Zusätzlich könnte überschüssiges DTT, welches nicht als Reduktionsmittel oxidiert wurde, mit seiner Thiolgruppe selber an die QDs binden und auf diese Weise zu einer verbesserten Wasserlöslichkeit führen. Auch in anderen aktuellen Studien wird DTT für eine verbesserte QD-Quantenausbeute verwendet (Duncan et al., 2009). Die dort untersuchten QDs besitzen zwar eine Silikathülle und keine Thiol-Liganden, dennoch scheint DTT die Quantenausbeute zu verbessern. Dies wird darauf zurückgeführt, dass durch die Anwesenheit des DTT die QD-Oberfläche vor Oxidation geschützt wird, die sonst zu einer verminderten Quantenausbeute der QDs führt. Reduktionsmittel scheinen also auf mehreren Wegen positiv auf die QD-Stabilität zu wirken, und es erscheint durchaus sinnvoll, in weiterführenden Experimenten ihren Einfluss weiter zu testen. Zusätzlich wäre es möglich über eine Vernetzung der Liganden ein Ablösen dieser von der QD-Oberfläche zu minimieren und die QDs auf diese Weise stabiler zu machen. Ein entsprechender Ansatz wurde von Zheng et al. (2008) verfolgt. Sie verwendeten Glutathion als Ligand, den sie anschließend zu einem Phytochelatin-ähnlichen Komplex polymerisierten. Die dadurch entstandenen QDs waren erstaunlich stabil und besaßen hohe Quantenausbeuten.

Wie im letzten Abschnitt schon angedeutet wurde, ist eine Veränderung der QD-Fluoreszenz nicht immer auf eine Aggregation zurückzuführen. Vielmehr ist die Fluoreszenzquantenausbeute ein Ergebnis der komplexen Interaktionen von QD-Kern, QD-

Hülle, dem Liganden und der Umgebung. Die Hülle dient dabei vor allem als Schutz des Kerns und erhöht die Quantenausbeute (Grabolle et al., 2008). In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene verwendet, wobei die entsprechenden QDs ähnliche Quantenausbeuten aufwiesen. Es wird daher davon ausgegangen, dass beide Hüllen den Kern gleichermaßen schützen (vgl. III.4.1). Fluoreszenzemissionsspektren von QDs mit verschiedenen Liganden zeigten dagegen Maxima bei unterschiedlichen Wellenlängen und Intensitäten - und dies obwohl in den Absorptionsspektren nur geringfügige Unterschiede auftraten (Abb. 3.4.1). Eine Liganden-abhängige Verschiebung der Fluoreszenz erklären Algar et al. (2007) damit, dass durch den Liganden die Abklingzeiten der spektralen Übergänge und damit das gesamte angeregte System verändert wird. Dies könnte auch auf den Vergleich von DPA- und DHLA-QDs zutreffen. In anderen Untersuchungen wurde gezeigt, dass auch die Kettenlänge des Liganden einen Einfluss auf die Quantenausbeute hat (Blum et al., 2008). Bei längeren Alkylketten traten höhere Ausbeuten auf als bei niedrigen, wobei dies auf eine stärkere Interaktion zwischen den einzelnen Liganden zurückgeführt wurde. Durch ihren hydrophoben Charakter halten sie außerdem Wasser davon ab an die QD-Oberfläche zu gelangen. Auch in den hier dargestellten Versuchen hatten QDs mit DHLA, und somit einem längeren Liganden, deutlich höhere Quantenausbeuten als DPA-QDs.

Das Fluoreszenzverhalten von QDs ist also sehr komplex. Es ist daher nicht erstaunlich, dass auch die einzelnen Pufferkomponenten Auswirkungen haben (vgl. Abb. 3.4.3). Die Phosphate des verwendeten NaP-Puffers können ähnlich dem in organischen Lösungsmitteln häufig verwendeten Liganden TOPO an den QD binden (Peng et al., 2000). Als Liganden können sie so womöglich direkt sein Fluoreszenzverhalten beeinflussen. Im Gegensatz dazu besitzen die weiteren Pufferkomponenten kein Phosphor oder eine Carboxyl-, Amino- oder Thiolgruppe. Deshalb wird nicht davon ausgegangen, dass sie direkt mit der Oberfläche der QDs interagieren. Dennoch verringern auch sie die Fluoreszenz der QDs deutlich. Jede neue Komponente sollte daher vor der Verwendung bezüglich ihrer Auswirkung auf den QD getestet werden.

2.3 Interaktionen zwischen QDs und LHCII

In dieser Arbeit lag das Hauptaugenmerk bezüglich der QDs auf QD-LHCII-Hybridkomplexen. Ausgehend von den Ergebnissen von Erker et al. (2009) wurde hier die Bindung des LHCII an die QDs näher untersucht und versucht, die Frage nach einem möglichen Energietransfer zwischen den Komplexen zu klären. Aufgrund der Verwendung verschiedener QD-Liganden sollen zusätzlich deren Vor- und Nachteile diskutiert werden.

2.3.1 Wie bindet der LHCII an QDs?

Anhand der vorangegangenen Versuche mit LHCII-Monomeren postulieren Stephanie Boggasch und Wolfgang Erker, dass je nach verwendetem LHCII-Klon die Interaktion mit den QDs unterschiedlich ist (Boggasch, 2006, Erker et al., 2009). Bei den von ihnen verwendeten DHLA-Multishell-QDs zeigten sie, dass es für eine Löschung der QD-Fluoreszenz entweder des N-Terminus oder eines „His-Tags“ bedarf. Beide Domänen zeigen hier ungefähr denselben Einfluss, allerdings führt die Bindung über den N-Terminus im Gegensatz zum „His-Tag“ nicht zu einer deutlich verringerten Migrationsgeschwindigkeit in einem Agarosegel. Daher kann davon ausgegangen werden, dass diese Interaktion schwächer ist als jene über den „His-Tag“. Die Experimente bezüglich der QD-Fluoreszenzlöschung sind allerdings nur ein indirekter Beweis für eine Interaktion von LHCII und QD, und obwohl das Laufverhalten im Agarosegel für eine Bindung spricht, gibt es hier keine entsprechenden Daten bezüglich der LHCII-Lokalisation. Daher wurde in dieser Arbeit versucht, einen direkten Beweis für eine Bindung von QD und LHCII zu erhalten. Die hierfür verwendete Auftrennung durch Dichtegradienten-Zentrifugation konnte allerdings nur mit LHCII-Trimeren durchgeführt werden (vgl. Abb. 3.6.4). Dies stellte jedoch kein Problem dar, da diese in Titrationsexperimenten zu einer QD-Fluoreszenzlöschung führten, die der von LHCII-Monomeren vergleichbar war (Tabelle III.1). Die Auftrennung von QD-LHCII-Mischungen verschiedener Verhältnisse und unter Verwendung von unterschiedlichen LHCII-Mutanten in einer Dichtegradienten-Zentrifugation bestätigte nun eine Bindung von LHCII und QD, die stark genug war, um während der Wanderung durch das Saccharosekissen nicht zerstört zu werden (vgl. III.6.2). Hier konnte analog zu den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden, dass sowohl der N-Terminus, als auch der „His-Tag“ mit den QDs interagieren. Die zusätzlich getesteten LHCII-Mutanten mit ZnS-Bindungssequenzen konnten ebenfalls an den QD binden und erweitern somit die zur Verfügung stehenden QD-LHCII-Bindungsmöglichkeiten.

Für die Interaktion über den N-Terminus scheint eine Ionenbindung zwischen den bei pH 8,5 negativ geladenen DHLA-Molekülen auf der QD-Oberfläche und vier potentiell positiv geladenen Aminosäuren in der N-terminalen Domäne des LHCII (Arg1, Lys2/7/8) sowie der

geladenen N-terminalen Aminogruppe plausibel. Eine solche elektrostatische Interaktion zwischen der Carboxylgruppe von DHLA und positiv geladenen Proteinen wurde schon in anderen Arbeiten untersucht und verwendet. Hierbei wurde unter anderem ein „Leucin-Zipper“ als bindendes Peptid gezielt an Proteine angefügt oder aber das positiv geladene Protein Avidin als Linker zwischen QD und Farbstoffen benutzt (Mattousi et al., 2000; Goldman et al., 2002). Auch Rinderserumalbumin scheint über entsprechende unspezifische Interaktionen mit QDs zu interagieren (Shao et al., 2009). In dieser Studie wurde die Bindung durch eine Erhöhung der Salzkonzentration verringert und auf diese Weise bestätigt. Ein entsprechender Ansatz könnte auch bei der Interaktion von QDs und der N-terminalen Domäne des LHCII zur Bestätigung der Ionenbindung verwendet werden.

Der „His-Tag“ interagiert dagegen aufgrund seiner Metallaffinität vermutlich direkt mit dem Zink auf der QD-Oberfläche (Medintz et al., 2003; Clapp et al., 2004). Er muss dafür die Ligandenhülle durchbrechen, wodurch die Interaktion von der Größe und Beschaffenheit der Liganden abhängt (Sapsford et al., 2007). Ein vergleichbares Szenario ist auch für die ZnS-bindenden Sequenzen von A7-N, Z8-N und Z8-C denkbar, da auch diese direkt mit der QD-Oberfläche interagieren (Lee et al., 2002; Flynn et al., 2003). In diesen Arbeiten wurde allerdings nie mit Liganden-besetztem ZnS gearbeitet, weshalb deren Einfluss auf die Bindung nur im Vergleich zu der Interaktion des „His-Tags“ beurteilt werden kann. Weiterhin lagen die Bindungsfähigkeiten von Z8-C deutlich unter denen von Z8-N (vgl. Abb. 3.6.7). Es erscheint daher wichtig bei der Verwendung von Bindungssequenzen die gleiche Peptidorientierung wie im „Phage-Display“ zu gewährleisten und wie in diesem Fall die Sequenzen N-terminal an den LHCII zu hängen.

Obwohl alle verwendeten LHCII-Mutanten an die QDs binden konnten, ergaben sich doch je nach verwendetem Klon und Liganden deutliche Unterschiede und Auffälligkeiten. Analog zu den Titrationsexperimenten interagierte D7f3, welcher nur den N-Terminus besitzt, bei der Verwendung von DHLA-Multishell-QDs deutlich schlechter mit den QDs als C3.2h, der zusätzlich mit seinem „His-Tag“ binden kann (vgl. Abb. 3.6.9). Bei der Verwendung von DHLA-6xZnS-QDs war dieser Unterschied dagegen viel geringer (Abb. 3.6.7). Dies wird auf ein unterschiedliches Alter der QD-Proben zurückgeführt. Die verwendeten Multishell-QDs waren bei den Experimenten älter, als die 6xZnS-QDs. Es ist daher gut möglich, dass bei letzteren noch deutlich mehr DHLA-Moleküle als Liganden auf der Oberfläche gebunden sind, obwohl beide Proben noch keine Anzeichen einer QD-Aggregation aufwiesen (vgl. IV2.2). Da D7f3 aber nur über die Liganden mit dem QD interagieren kann, ist seine Bindungsfähigkeit in direktem Maße vom Alter der QDs abhängig. Während bei neuen Proben eine effektive Bindung beobachtet wird (6xZnS-QDs), kann dieser LHCII-Klon bei älteren Proben (Multishell-QDs) kaum noch binden.

Ein weiterer Unterschied in der LHCII-Bindung ergab sich bei der Verwendung unterschiedlicher Liganden (vgl. III.6.2.2). Aufgrund der Differenzen im eingesetzten [QD]/[LHCII]-Verhältnis kann zwar leider keine Aussage gemacht werden, bei welchem Liganden prozentual mehr LHCII gebunden wird, dennoch wird deutlich, dass die Unterschiede zwischen den LHCII-Mutanten von den Liganden beeinflusst werden. Während bei DHLA-QDs alle Klone im Großen und Ganzen gleich stark interagierten, ergaben sich bei DPA-QDs deutliche Unterschiede (vgl. Abb. 3.6.7). Die Interaktion über die positiven Ladungen der N-terminalen LHCII-Domänen kann bei DPA nur begrenzt stattfinden. Im Gegensatz zu DHLA besitzt es nämlich neben einer (negativ geladenen) Carboxylgruppe auch eine (positiv geladene) Aminogruppe und ist somit bei dem verwendeten pH ein Zwitterion. Da alle verwendeten LHCII-Mutanten die N-terminale Domäne besaßen und die QD-Oberfläche aufgrund des geringen Alters der QD noch optimal mit DHLA-Liganden besetzt war, gab es dort keinen großen Unterschied im Bindeverhalten. Bei DPA-QDs haben die direkten Interaktionen mit der QD-Oberfläche dagegen größere Auswirkung. Es scheint außerdem plausibel, dass eine solche direkte Bindung bei DPA-QDs leichter stattfinden kann, da dieser Ligand nur eine Thiolgruppe besitzt. Er nimmt damit erstens weniger Platz auf der Oberfläche in Anspruch, zweitens kann er möglicherweise besser von den bindenden Peptidsequenzen verdrängt werden. Zusätzlich besitzt er im Gegensatz zum DHLA keinen hydrophoben Abschnitt, der für ein interagierendes, wasserlösliches Peptid eine Barriere darstellen kann (vgl. Sapsford et al., 2007). Aufgrund der Abwesenheit von Sequenzabschnitten, die spezifisch an die QD-Oberfläche binden, interagiert D7f3 vergleichsweise schwach mit DPA-QDs und bei der Verwendung der anderen LHCII-Mutanten können die unterschiedlichen QD-Affinitäten der bindenden Sequenzen genauer betrachtet werden. Hier zeigt sich, dass Z8-N am effektivsten mit den QDs interagiert, ihm folgt die zweite ZnS-bindende Sequenz und anschließend der „His-Tag“. Dass die A7-Sequenz hier schlechter interagiert als Z8 steht im Gegensatz zu den „Phage-Display“-Versuchen (Flynn et al., 2003), kann aber wie folgt erklärt werden. Für eine ZnS-Bindung benötigt A7 eine interne Disulfidbrücke. Die Tatsache, dass die Zugabe von DTT die Bindung nicht veränderte (vgl. Abb. 3.6.8), legt nahe, dass schon vorher keine Disulfidbrücken vorhanden waren, wodurch die Interaktion mit ZnS generell gestört wurde.

Eine letzte Auffälligkeit bezüglich der Bindeversuche betrifft die Fraktion des ungebundenen LHCII. Während diese nach Inkubation mit DPA-QDs ein einziges Fluoreszenzmaximum bei 680 nm aufwies und somit intakte LHCII-Trimere enthielt, wurde bei Verwendung von DHLA-QDs ein deutliches Chl *b*-Signal detektiert (vgl. Abb. 3.6.6). Dies bedeutet, dass sich hier ungebundene Chl *b*-Moleküle befanden. Es wäre denkbar, dass sie bei einem kompletten Zerfall einiger LHCII freigesetzt worden sind. Dies ist aber eher auszuschließen. Dabei auch frei werdende Chl *a* fluoreszieren einige Nanometer

kurzwelliger als der intakte LHCII. In den entsprechenden Fluoreszenzspektren ist indes noch nicht mal aufgrund der Chl *b*-Schulter eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums zu beobachten. Im LHCII-Komplex binden die Chl *b* in eher peripherer Lage (Standfuss et al., 2005). Die Tatsache, dass in der ersten Strukturanalyse zwei Chlorophylle (ein Chl *a* und ein Chl *b*) weniger detektiert wurden als in späteren Analysen (vgl. Kühlbrandt et al., 1994; Liu et al., 2004, Standfuss et al., 2005), lässt die Schlussfolgerung zu, dass diese möglicherweise weniger fest gebunden sind. Wenn sich ein Chl *b* ablöst, muss die Komplexstabilität allerdings nicht deutlich verringert sein (vgl. IV1.2.2). Bindet nun LHCII an die QDs, werden diese zusammen mit den QDs durch das Saccharosekissen pelletiert. Es scheint möglich, dass die Kräfte, die zum Sedimentieren der QDs führen, so stark sind, dass schwach gebundene Chl *b*-Moleküle vom Pigment-Protein-Komplex getrennt werden und sich nun diese freien Chl *b* in der Fraktion des ungebundenen LHCII befinden. Durch die Zugabe von DTT in den Bindungsansatz verschwand dieses Phänomen (vgl. Abb. 3.6.8). Möglicherweise führt das DTT durch die Reduktion des Liganden dazu, dass kleine QD-Aggregate gelöst werden (vgl. IV2.2). Somit verringern sich die Kräfte, die zur Sedimentation führen und die Chl *b*-Moleküle werden nicht vom Pigment-Protein-Komplex getrennt. Unter dem verwendeten [QD]/[LHCII]-Verhältnis interagierten dagegen sehr viel weniger LHCII mit den DPA-QDs, wodurch es plausibel erscheint, dass erstens weniger freies Chl *b* entsteht und zweitens ihre Fluoreszenz bei 660 nm durch das intensive LHCII-Fluoreszenzsignal überdeckt wird. Dadurch zeigten hier die Fluoreszenzemissionsspektren der freien LHCII-Fraktionen keine Auffälligkeiten.

Tabelle IV.3 Apparente Bindungskonstanten für LHCII und DHLA-Mulitshell-QDs.

Anhand der berechneten Konzentrationen an freiem LHCII in Bezug auf die eingesetzten LHCII- und QD-Mengen wurden die Assoziationskonstanten für eine LHCII-Bindestellen pro QD berechnet (s. II7.5). Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Ergebnisse der [QD]/[LHCII]-Verhältnisse 1 und 2.

	$K_a [\mu\text{M}^{-1}]$
C3.2h	$22,7 \pm 7,3$
D7f3	$0,63 \pm 0,26$

In dieser Arbeit kann mithilfe der Ergebnisse zur Erstellung von Bindungskurven eine theoretische Einschätzung für die Größenordnung der Bindungskonstante von LHCII und QD vorgenommen werden (vgl. Abb. 3.6.9). Unter der Annahme, dass es sich um ein Gleichgewichtssystem handelt, wurden für den (hypothetischen, sicher nicht realen) Fall, dass jeweils nur ein LHCII pro QD bindet, die Assoziationskonstanten berechnet. Die so erhaltene Bindungskonstante für C3.2h von $22 \mu\text{M}^{-1}$ ist vergleichbar mit Werten für andere

„His-Tag“-Proteine (Dennis & Bao, 2008). Hier werden Dissoziationskonstanten von 50-100 nM angegeben, was Assoziationskonstanten von $10\text{-}20\ \mu\text{M}^{-1}$ entspricht. Der Wert für D7f3 liegt dagegen weit unter den $10\ \mu\text{M}^{-1}$, die von Shao et al. (2009) für die elektrostatische Interaktion zwischen QDs und Rinderserumalbumin berechnet wurde. Dies kann jedoch auf die altersbedingt geringe DHLA-Belegung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten QDs zurück geführt werden (vgl. IV2.3.1). Obwohl durch diese Werte ein Vergleich zu anderen Studien möglich wird, sollte beachtet werden, dass es unwahrscheinlich ist, dass jeweils nur ein LHCII pro QD bindet; die durch sterische Abschätzung ermittelte maximale Belegungszahl beträgt immerhin 18 LHCII pro QD (Boggasch, 2006).

Um die tatsächlichen Bindungskonstanten zu berechnen, bedarf es noch einiger weiterer Untersuchungen, die auch dazu führen werden, den Mechanismus der Bindung komplett zu verstehen. Hierfür stellt die Trennung von freiem und QD-gebundenem LHCII durch Dichtegradienten-Zentrifugation eine nutzbare Methode dar. Mit ihr kann experimentell geklärt werden, wie viele LHCII maximal an die QDs binden können, ob die Bindungsreaktion ein Gleichgewicht darstellt, wie lange es dauert, bis sich eine Bindung zwischen LHCII und QD ausbildet und ob diese Reaktion von den eingesetzten Konzentrationen abhängig ist.

2.3.2 Energietransferbetrachtungen

Für mögliche Anwendungen von QD-LHCII-Hybridkomplexen ist es notwendig, dass ein effektiver Energietransfer zwischen QD und LHCII stattfinden kann. In vielen Studien wurde gezeigt, dass QDs als Donoren zu einem Energietransfer fähig sind (Medintz & Mattousi, 2009). Der dabei zugrunde liegende Mechanismus ist hier vermutlich auch der Förster-Resonanz-Energietransfer (Pons et al., 2007). Dieser Mechanismus wird in Fluoreszenzmessungen durch eine gleichzeitig auftretende Löschung der Donorfluoreszenz und Steigerung der Akzeptorfluoreszenz – im Vergleich zu den Fluoreszenzintensitäten der Einzelkomponenten – bestätigt (Miller, 2005, vgl. IV1.4.2 und IV1.5.2). Bei den in dieser Arbeit untersuchten Hybridkomplexen war zwar immer eine deutliche QD-Fluoreszenzlöschung zu beobachten, jedoch konnte kein Zuwachs der LHCII-Fluoreszenz verzeichnet werden. Bei den verwendeten Multishell-QDs verringerte sich sogar die LHCII-Fluoreszenz (vgl. Abb. 3.5.3). Demnach ist in den hier untersuchten Komplexen kein eindeutiger Energietransfer nachzuweisen und es stellt sich die Frage, woran das liegt.

Die verwendeten Multishell-QDs haben einen Durchmesser von 7 nm (Xie et al., 2005a). Der anhand der spektralen Eigenschaften berechnete Försterradius beträgt für diese QDs 3,5 nm zu Chl *a* und 4,3 nm zu Chl *b* (Boggasch, 2006). Um den somit zu erwartenden Energietransfer zu berechnen, wird auch bei QDs der „center-to-center“-Abstand verwendet (vgl. Medintz et al., 2006) – also der Abstand vom Mittelpunkt der QDs zum Mittelpunkt des

Fluorophors. Letzteres ist beim LHCII schwierig, da er mit 14 gebundenen Chlorophyllen viele potentielle Akzeptorfarbstoffe besitzt, deren relative Lage zum QD aufgrund der Flexibilität der bindenden Peptidsequenzen nur theoretisch angenommen werden kann. Daher wurde hier der Einfachheit halber nur der QD-Radius als Abstand angenommen. Obwohl davon ausgegangen wird, dass dieser Abstand sehr viel geringer ist als der tatsächliche, zeigt sich schon hier, dass für die Mulitshell-QDs mit 50% bzw. 77,5% kein vollständiger Energietransfer zu erwarten ist (Tabelle IV.4). Dieser erhöht sich zwar aufgrund der Anwesenheit vieler potentieller Akzeptoren und der Möglichkeit, dass sich Försterradien, die anhand der spektralen Eigenschaften berechnet wurden, bei QDs als zu groß herausstellen können (Pons et al., 2007), dennoch scheinen diese QDs nicht besonders für eine Verwendung in Hybridkomplexen mit dem LHCII geeignet.

Tabelle IV.4 Försterradien (R_0) der verwendeten DHLA-QDs und LHCII.

Es sind jeweils die Försterradien für den Energietransfer von QD zu LHCII angegeben. Für die Werte des erwarteten Energietransfers wurde vorausgesetzt, dass jeweils nur ein LHCII an einen QD gebunden hat, zusätzlich wurde als Abstand zwischen QD und LHCII der Radius der jeweiligen QDs verwendet.

	R_0 [Å]		Durchmesser der QDs [Å]	Erwarteter Energietransfer [%]	
	Chl a	Chl b		Chl a	Chl b
Mulitshell-QDs	35,0*	43,0*	70	50,0	77,5
6xZnS-QDs	41,3	41,1	60	87,2	86,8

* Daten aus Boggasch, 2006 übernommen.

Die Erklärung für den fehlenden Akzeptor-(LHCII)-Zuwachs bei Hybridkomplexen aus LHCII und Mulitshell-QDs wäre demnach, dass kein Energietransfer stattfindet. Das würde allerdings bedeuten, dass die beobachtete Löschung der QD-Fluoreszenz eine andere Ursache hat. Hier wäre es möglich, dass allein die Bindung eines Proteins an diese QDs zu einer verringerten Fluoreszenzquantenausbeute führt. Ein solches Szenario ist für die verwendeten 6xZnS-QDs auszuschließen, da für diese QDs eine entsprechende Kontrolle durchgeführt wurde. Bei der Inkubation mit unpigmentiertem WSCP, welches einen „His-Tag“ besitzt, kam es nicht zu einer Löschung der Fluoreszenz, im Gegenteil stieg die QD-Fluoreszenzintensität sogar geringfügig (vgl. Abb. 3.5.5 und Abb. 3.5.7). Ähnliches wurde auch bei anderen CdSe/ZnS-QDs beobachtet (vgl. Mattousi et al.; 2000, Clapp et al., 2004). Es scheint plausibel, dass hierbei die Proteine wie zusätzliche Liganden fungieren und somit möglichen Aggregationsereignissen entgegen wirken, welche sonst zu einer geringeren Fluorezenzintensität führen (vgl. IV.2.2). Bisher erfolgte zwar kein Nachweis der tatsächlichen Bindung von WSCP an die QDs, dennoch erscheint es schon jetzt gerechtfertigt, die bei der Inkubation mit LHCII zu beobachtende Löschung der QD-Fluoreszenz auf die Anwesenheit

der Chlorophylle, und somit potentiellen Energieakzeptoren, zurückzuführen. Dies würde also einen Energietransfer zwischen den Komponenten bedeuten, welcher auch bei der Betrachtung des erwarteten Energietransfers plausibel erscheint. Er liegt hier aufgrund des kleineren QD-Durchmessers der DHLA-6xZnS-QDs mit über 85% deutlich höher als bei den Multishell-QDs (Tabelle IV.4).

Der einzig ausbleibende Beweis für einen tatsächlichen Energietransfer ist allerdings auch hier eine stimulierte Akzeptorfluoreszenz. Allerdings bleibt zu bedenken, dass in den durchgeführten Versuchen die QD-Fluoreszenz um ein Zehnfaches schwächer war als die des LHCII (vgl. Abb. 3.5.4). Somit ist der erwartete Flächenzuwachs auf Seiten des LHCII prozentual gering und vielleicht nicht gut zu detektieren (vgl. IV1.5.1). Zusätzlich ist es möglich, dass auch bei diesen QDs die LHCII-Quantenausbeute bei der Interaktion mit den QDs verringert wird (vgl. Abb. 3.5.3; Eck, 2009). Letzteres würde bedeuten, dass eine gleiche LHCII-Intensität bei QD-freien sowie -haltigen Proben nur aufgrund einer sensibilisierten Akzeptorfluoreszenz zustande kommen kann. Um dieses zu bestätigen, sollte in zukünftigen Versuchen die Fluoreszenzquantenausbeute von QD-gebundenem LHCII untersucht werden, zusätzlich würde eine höhere QD-Fluoreszenz die Auswertung erleichtern.

Neben den bisher erläuterten möglichen Ursachen für einen nicht eindeutig nachzuweisenden Energietransfer zwischen QDs und LHCII ergeben sich auch aus dem generellen Versuchsaufbau einige Besonderheiten. Zu allererst ist hier die Verwendung eines Membranproteins und damit verbunden die Anwesenheit von Detergenz in den Ansätzen zu nennen. Diese sind in den meisten Beispielen für einen Energietransfer zwischen QDs und fluoreszierenden Proteinen nicht zu finden (z.B. Hering et al., 2007). Allerdings konnte auch in Anwesenheit von Liposomen mit Farbstoffen, die an die membranständige ATPase gebunden wurden, sowie mit QDs, die durch eine micelläre Struktur in wässriger Lösung stabilisiert waren, ein entsprechender Energietransfer gezeigt werden (Galvez et al., 2008; Dennis & Bao, 2008). Beides entspricht zwar nicht ganz den Bedingungen, die in dieser Arbeit verwendeten wurden, dennoch kann anhand dieser Ergebnisse kein generell negativer Einfluss von Detergentien angenommen werden. Eine weitere Besonderheit der Verwendung von LHCII ist die schon angesprochene große Anzahl an potentiellen Energieakzeptoren. Allerdings gibt es auch hier durch Versuche mit QDs und Phycoerythrin ein Beispiel für die Funktionalität des Energietransfers solcher Hybridkomplexe (Medintz et al., 2009). Bei der Betrachtung all dieser Studien fällt jedoch auf, dass oftmals höhere QD- und Proteinkonzentrationen eingesetzt werden als in der vorliegenden Arbeit. Während in den hier durchgeführten Versuchen zum Energietransfer zwischen QD und LHCII meist Konzentrationen von 15 nmol/l QD verwendet wurden, liegen die entsprechenden Werte in der Literatur mindestens zehnmal so hoch (Medintz et al.,

2004), wobei auch Konzentrationen von bis zu 50 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt werden (Gerhards et al., 2008). Es wäre durchaus möglich, dass sich bei diesen Konzentrationen mehr Bindungen zwischen Proteinen und QDs ausbilden und dadurch auch der beobachtete Energietransfer stärker ausfällt. Als letzte Besonderheit bleibt noch ein Gedanke bezüglich der Orientierung des LHCII zu den QDs. Obwohl die N-terminale Domäne durch fünf potentiell positive Ladungen an die negative Liponsäure binden kann, ist die Nettoladung des LHCII negativ. Es erscheint denkbar, dass er dadurch generell von den QDs abgestoßen wird und somit der prinzipiell flexible N-Terminus in seiner gesamten Länge ausgestreckt vorliegt, um den Abstand zwischen LHCII und QD möglichst maximal zu halten. Dieses würde offensichtlich Weise kontraproduktiv für einen erhofften Energietransfer sein. Durch die Verwendung eines positiv geladenen oder neutralen Liganden könnte dieses Problem gelöst werden. Hier bietet sich z.B. das auch untersuchte D-Penicillamin an, wobei die durchgeführten Versuche leider aufgrund der geringen Fluoreszenzquantenausbeuten nicht genauer bezüglich des Energietransfers untersucht werden konnten (vgl. Abb. 3.5.6).

Es wird deutlich, dass zu diesem Zeitpunkt noch nicht mit endgültiger Gewissheit von einem Energietransfer zwischen 6xZnS-QDs und LHCII gesprochen werden kann. Dennoch scheint ein solcher durchaus möglich, wobei die genannten Kontrollen bzw. Optimierungen der Versuche, diese Annahme bestätigen könnten.

2.3.3 Welcher Ligand ist zu bevorzugen?

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse verdeutlichen die entscheidende Rolle der QD-Liganden. Sie beeinflussen nicht nur die Wasserlöslichkeit der QDs, sondern wirken auch entscheidend auf ihre spektralen Eigenschaften und ihre möglichen Interaktionen mit dem LHCII. Ihre Auswahl ist damit für weiterführende Experimente vielleicht sogar wichtiger als die verwendeten Halbleitermaterialien. Letztere beeinflussen natürlich, ob ein entsprechender QD als Energiedonor oder –akzeptor fungiert und ob es überhaupt zu einem Energietransfer mit dem LHCII kommen kann. Die Ausprägung der Interaktionen hängt dann aber entscheidend vom Liganden ab. Daher sollen im Folgenden die Vor- und Nachteile der beiden verwendeten Liganden dargestellt werden.

Im ersten Moment erscheint die Tatsache, dass DHLA im Gegensatz zu DPA zwei Thiole besitzt, am wichtigsten. Dies ist gleichbedeutend mit einer besseren Interaktion zwischen dem QD und dem Liganden und damit verbunden mit einer verringerten Aggregationshäufigkeit der DHLA-QDs (vgl. IV2.2). Jedoch bedeutet dies im Gegenzug, dass DPA leichter verdrängt werden kann und es damit ZnS-bindenden Sequenzen wie dem „His-Tag“ und der A7- bzw. Z8-Sequenz leichter fällt an die QD-Oberfläche zu gelangen (vgl. IV2.3.1). Dadurch ist bei DPA-QDs eine spezifischere Bindung zwischen LHCII und QD

möglich. Zusätzlich verringert sich durch die direkte Interaktion mit der Oberfläche der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, wodurch ein möglicher Energietransfer effektiver wird (vgl. IV2.3.2). Durch die eher unspezifische Interaktion zwischen DHLA und dem N-Terminus des LHCII binden dagegen sehr viel mehr LHCII-Mutanten. Diese Bindung kann allerdings bei zukünftigen Experimenten mit N-terminal Farbstoff-markierten LHCII gestört werden, wobei sich eine spezifische QD-interagierende Sequenz als Vorteil darstellen könnte. Zusätzlich ist der zu verwendende pH bei DHLA-QDs auf den basischen Bereich beschränkt, da nur hier die Carboxylgruppe deprotoniert und somit geladen vorliegt. Unterhalb ihres pK-Wertes fehlt mit der Ladung auch die elektrostatische Abstoßung der QDs untereinander, wodurch sie schneller aggregieren (Algar & Krull, 2007). Weiterhin könnte die negative Ladung von DHLA-QDs in Bezug auf die Nettoladung des LHCII ein Problem darstellen (vgl. IV2.3.2). Generell sollte aber auch der auf den ersten Blick eher uninteressante Molekülbereich zwischen dem QD-bindenden Thiol und den Gruppen, die die Hydrophilie vermitteln, für die Eignung des Liganden in Betracht gezogen werden. Durch seine hydrophoben Anteile ist DHLA in der Lage Wasser und damit indirekt oxidative Schäden von der QD-Oberfläche fernzuhalten. Dadurch erhöht sich die Fluoreszenzquantenausbeute der QDs (Blum et al., 2008; vgl. IV2.2). Dies ist zwar womöglich für eine Nutzung der Hybridkomplexe nicht unbedingt wichtig, erleichtert aber eine genauere Analyse des Energietransfers (vgl. IV1.2.2 und IV2.3.2).

Beide in dieser Arbeit verwendeten Liganden haben demnach ganz unterschiedliche Vorzüge und es ist wohl von der jeweiligen Fragestellung abhängig, welcher zu favorisieren ist. Es erscheint auch sinnvoll, weitere Liganden auf ihre Eigenschaften hin zu testen. Hier bietet sich vor allem ein positiver oder zwitterionischer Ligand an, der über eine Gruppe mit dem QD interagiert und einen zwar nicht zu langen aber doch ausgeprägten hydrophoben Bereich besitzt.

3 Allgemeine Schlussfolgerung und zukünftige Experimente

Ein Fernziel der vorliegenden Arbeit ist die mögliche Nutzung des LHCII in technologischen Anwendungen, wobei der denkbarste Einsatz in der Photovoltaik liegt. Hierfür eignet sich der LHCII aufgrund einer hohen Anzahl an gebundenen Chromophoren und damit verbunden einem optimalen Extinktionskoeffizienten. Zusätzlich bietet die Tatsache, dass der LHCII *in vitro* rekonstituiert werden kann, die Möglichkeit, selbstorganisierende Komponenten zu entwickeln.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass der Einsatz des LHCII sehr flexibel sein kann. In allen untersuchten Hybridkomplexen wurde mindestens ansatzweise ein Energietransfer beobachtet, wobei der LHCII sowohl als Donor als auch als Akzeptor diente. Zusätzlich konnten diverse Veränderungen auf Proteinebene vorgenommen werden, ohne dass die Struktur des Pigment-Protein-Komplexes dramatisch beeinflusst worden wäre. Hierzu zählen die kovalente Bindung von vier Farbstoffen und die terminale Fusion mit verschiedenen Peptiden. Es kann davon ausgegangen werden, dass unter der Berücksichtigung der Chlorophyll-bindenden Proteinabschnitte auch diverse weitere Änderungen des Proteins vorgenommen werden können, ohne dass die Struktur und Funktion gestört wird. Die meisten in dieser Arbeit hergestellten Hybridkomplexe enthielten LHCII-Trimere. Es war dabei kein Nachteil im Vergleich zu Monomeren zu beobachten, vielmehr ist die weitere Verwendung von Trimeren in Bezug auf die höhere Komplexstabilität zu bevorzugen.

Dennoch wird die damit erreichte Stabilität vermutlich nicht ausreichen, um in tatsächlichen technischen Anwendungen ohne weiteres LHCII zu verwenden und es bedarf weiteren stabilisierenden Bedingungen. Ein möglicher Weg dies zu erreichen ist die Verpackung in Silikatschalen, da diese z.B. dazu führen, dass die Aktivität von Enzymen auch bei hohen Temperaturen erhalten bleibt (Luckarift et al., 2004; Chien & Lee, 2008). In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harald Paulsen wird zurzeit untersucht, ob dieses Prinzip auch auf den LHCII übertragen werden kann, wobei in ersten Versuchen, in denen LHCII in Silikatfällungsansätzen co-präzipitiert wurde, eine erhöhte Temperaturresistenz des LHCII zu beobachten war (Cordes, 2010). Eine weitere Möglichkeit beinhaltet die Arbeit mit Liposomen. Als Membranprotein kann der LHCII nur in Anwesenheit von Detergentien verwendet werden, wobei diese aufgrund der flexiblen Mizellenstruktur durchaus schwierige Bedingungen schaffen. Die Verwendung von LHCII, der in Liposomen integriert ist, könnte nicht nur diese Probleme minimieren, sondern führt zusätzlich zu stabileren Komplexen (Yang et al., 2006). Weiterhin würde dies zum einen die Möglichkeit eröffnen mit Farbstoffen zu arbeiten, die in wässriger Lösung aggregieren und dadurch geringe Fluoreszenzquantenausbeuten besitzen (vgl. Tang et al., 2007). Zum anderen können bei

entsprechendem Lipid/Protein-Verhältnis mehrere LHCII-Trimere ihre Energie auf einen gemeinsamen Akzeptor transferieren (Boggasch, 2006), wodurch eine alternative Struktureinheit für Hybridkomplexe entsteht.

Diese unterschiedlichen Ansätze bedürfen jedoch jeweils noch einiger grundlegender Forschung, bevor sie für weitere Anwendungen verwendet werden können. In der direkten Weiterführung der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse ergeben sich dagegen andere Experimente. Dabei stellt die Untersuchung der Elektroneninjektion durch die Verwendung von LHCII in DSSCs eine entscheidende erste Frage dar. Kann hier bei der Verwendung von Rylene-Farbstoffen kein Erfolg erzielt werden, können alternativ auch QDs als Elektroneninjektoren fungieren (Kamat, 2008). Hierbei könnte die durch Versuche von CdSe-QDs mit Methylviologen festgestellte extrem schnelle Ladungstrennung von Vorteil sein (Matyilitsky et al., 2009). Jedoch müssen dabei QDs verwendet werden, die im NIR-Bereich absorbieren und somit Energie vom LHCII aufnehmen können. Hierfür kommen sogenannte Typ II-QDs in Frage (Kim et al., 2003; Xie et al., 2005b), allerdings gibt es auch Beispiele von Typ I-QDs deren spektralen Eigenschaften durch spezifische Legierungsprozesse in längerwellige Bereiche verschoben werden konnten (Liang et al., 2009).

Ein weiterer Schritt ist die Verwendung von LHCII, dessen Grünlücke durch Farbstoffe gefüllt ist, um eine maximale Nutzung des Sonnenlichtes zu gewährleisten. Dabei würden Hybridkomplexe aus drei Komponenten entstehen. Diese wären LHCII, Donorfarbstoffe und ein Akzeptor (Farbstoff oder QD). Erste Versuche mit solchen Strukturen wiesen auf einen erfolgreichen Energietransfer über die drei Komplexe hinweg hin (Eck, 2009).

Es wird somit deutlich, dass die hier vorliegende Arbeit den Ausgangspunkt für verschiedenste weiterführende Versuche inklusive der technologischen Nutzung des LHCII darstellt. Hierbei lässt die Vielzahl an möglichen Variationen nicht zu, ein definiertes Ziel zu benennen, vielmehr befindet man sich mitten auf einem sehr spannenden Weg.

V Zusammenfassung

Der Lichtsammelkomplex II (LHCII) höherer Pflanzen ist eines der häufigsten Membranproteine der Welt. Er bindet 14 Chlorophylle und 4 Carotinoide nicht kovalent und fungiert *in vivo* als Lichtantenne des Photosystems II. Eine optimale Absorption von Licht ist auch bei Solarzellen entscheidend und es liegt nahe hier dasselbe Prinzip zu verwenden. Dafür bietet sich der Einsatz biologischer Komponenten wie des LHCII an. Dieser wurde evolutionär für eine effektive Absorption und Weiterleitung von Sonnenenergie optimiert. Zusätzlich lässt er sich *in vitro* in rekombinanter Form rekonstituieren. Für eine eventuelle Nutzung des LHCII in technologischen Anwendungen bedarf es der Interaktion mit anderen, vorzugsweise synthetischen Komponenten. Daher wurde die Bindung und der Energietransfer zwischen dem LHCII und organischen Fluoreszenzfarbstoffen sowie anorganischen „Quantum dots“ (QDs) untersucht.

Mit Donorfarbstoffen wurde die Grünücke des LHCII funktionell geschlossen. Dafür wurden bis zu vier Fluoreszenzfarbstoffe kovalent an den LHCII gebunden. Diese Interaktion erfolgte sowohl mit Maleimiden an Cysteinen als auch mit N-Hydroxysuccinimidylestern an Lysinen. Die Assemblierung, Struktur und Funktion des Pigment-Protein-Komplexes wurde durch die Fluoreszenzfarbstoffe nicht gestört.

Auf der Suche nach einem Farbstoff, der als Akzeptor die vom LHCII aufgenommene Energie übernimmt und durch Elektronenabgabe in elektrische Energie umwandelt, wurden drei Rylene Farbstoffe, ein Quaterrylen und zwei Terrylene, untersucht. Der LHCII konnte mit allen Farbstoffen erfolgreich markiert werden. Für die Nutzung der Hybridkomplexe ergaben sich allerdings Probleme. Das Quaterrylen beeinträchtigte aufgrund seiner Hydrophobizität die Rekonstitution des Proteins, während bei beiden Terrylenen der Energietransfer ineffizient war.

Zusätzlich zu den Standard-Verknüpfungen zwischen Farbstoffen und Proteinen wurde in dieser Arbeit die „native chemische Ligation“ etabliert. Hierfür wurde eine LHCII-Mutante mit N-terminalem Cystein hergestellt, markiert und rekonstituiert. Messdaten an diesem Hybridkomplex ließen auf einen Energietransfer zwischen Farbstoff und Protein schließen.

In Hybridkomplexen sollen langfristig zur Ladungstrennung fähige Typ II-QDs Anwendung finden, wobei der LHCII als Lichtantenne dienen soll. Bis diese QDs verwendet werden können, wurden grundlegende Fragen der Interaktion beider Materialien an Typ I-QDs mit Energietransfer zum LHCII untersucht. Dabei zeigte sich, dass QDs in wässriger Lösung schnell aggregieren und entsprechende Kontrollen wichtig sind. Weiterführend konnte anhand der Trennung von ungebundenem und QD-gebundenem LHCII die Bindung von LHCII an QDs bestätigt werden. Dabei wurden Unterschiede in der Bindungseffizienz in Abhängigkeit der verwendeten LHCII und QDs festgestellt. Durch Herstellung von Fusionsproteinen aus LHCII und Affinitätspeptiden konnte die Bindung optimiert werden. Ein Energietransfer von QDs zu LHCII war nicht sicher nachzuweisen, da in den Hybridkomplexen zwar die QD- (Donor-) Fluoreszenz gelöscht, aber die LHCII- (Akzeptor-) Fluoreszenz nicht entsprechend stimuliert wurde.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit einige Hybridkomplexe hergestellt, die in weiterführenden Ansätzen Verwendung finden können. Auf die hier gewonnenen Erkenntnisse über Interaktionen zwischen LHCII und synthetischen Materialien kann jetzt weiter aufgebaut werden.

Summary

The light-harvesting complex II (LHCII) is one of the most abundant membrane proteins. It binds non-covalently 14 chlorophylls and 4 carotenoids and acts *in vivo* as a light-antenna for Photosystem II. Optimal light absorption is also desirable in solar cells. This can possibly be achieved by using biological components like LHCII. This complex is not only evolutionary optimised for this purpose but furthermore it can be reconstituted *in vitro*. In such applications, LHCII would have to interact with synthetic components. Therefore, the binding and energy transfer between LHCII, organic dyes and inorganic quantum dots (QDs) were analysed in this work.

The absorption “green gap” of the LHCII was functionally filled in by covalently attaching up to four donor dyes. Dye maleimides were bound to cystein residues and N-hydroxysuccinimide esters to lysin residues. Neither modification interfered with the assembly, structure and function of the pigment-protein-complex.

Three rylene dyes, a quaterrylene and two terrylenes, were examined for their suitability to act as acceptors of the LHCII-absorbed energy. All dyes were successfully bound to the protein, however the hybrid complexes did not turn out to be useful. The hydrophobicity of the quaterrylene disturbed protein folding, whereas the energy transfer was inefficient with both terrylenes.

As an additional labelling technique, the “native chemical ligation” was established for the LHCII. A new mutant with an N-terminal cysteine was produced, labelled and reconstituted and the data suggested an energy transfer between dye and protein.

Type-II QDs are capable of charge transfer and they shall be integrated with the LHCII in hybrid complexes. Until they can be used, basic questions regarding the interaction of both materials were analysed by using type-I QDs acting as energy donors for the LHCII. It was shown that QDs tend to aggregate in aqueous solution and corresponding controls are necessary. The binding of both components was verified by separating unlabelled from QD-bound LHCII. Furthermore, differences in binding efficiencies depending on the components used were detected by this technique. Newly synthesised fusion proteins of LHCII and affinity peptides optimised the binding. The QD (donor) fluorescence was quenched in hybrid complexes; however a corresponding sensitised LHCII (acceptor) fluorescence was not detected. Therefore an energy transfer could not be verified so far.

In summary, several usable hybrid complexes were produced and the new information about interactions between LHCII and synthetic materials will lead to the construction of applicable hybrids.

VI Literaturverzeichnis

Aldana, J., Wang, Y. A., Peng, X. G. (2001) Photochemical instability of CdSe nanocrystals coated by hydrophilic thiols. *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 8844–8850.

Algar, W. R., Krull, U. J. (2007) Luminescence and stability of aqueous thioalkyl acid capped CdSe/ZnS quantum dots correlated to ligand ionization. *ChemPhysChem*, 8, 561–568.

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

van Amerongen, H., van Grondelle, R. (2001) Understanding the energy transfer function of LHCII, the major light-harvesting complex of green plants. *J. Phys. Chem. B*, 105, 604–617.

Barber, J. (2009) Photosynthetic energy conversion: natural and artificial. *Chem. Soc. Rev.*, 38, 185–196.

Barros, T., Kühlbrandt, W. (2009) Crystallisation, structure and function of plant light-harvesting complex II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1787, 753–772.

Barros, T., Royant, A., Standfuss, J., Dreuw, A., Kühlbrandt, W. (2008) Crystal structure of plant light-harvesting complex shows the active, energy-transmitting state. *EMBO J.*, 28, 298–306.

Beddard, G. S., Porter, G. (1976) Concentration quenching in chlorophyll. *Nature*, 260, 366–376.

Bektas, I. (2010) Das wasserlösliche Chlorophyll-Protein (WSCP): biochemische Charakterisierung und Untersuchungen zur biologischen Funktion. *Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Beligere, G. S., Dawson, P. E. (1999) Conformationally assisted protein ligation using C-terminal thioester peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 121, 6332–6333.

Bender, A. (2004) Konformationsanalyse und Lipidbindung am rekombinanten Lichtsammelprotein LHCIIb höherer Pflanzen. *Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2003) Biochemie. 5. Auflage, Heidelberg, *Spektrum Akademischer Verlag*.

Blum, A. S., Moore, M. H., Ratna, B. R. (2008) Quantum dot fluorescence as a function of alkyl chain length in aqueous environments. *Langmuir*, 24, 9194–9197.

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

Boggasch, S. (2006) Immobilisierung von rekombinantem Haupt-Lichtsammelkomplex LHCIIb in Liposomen, an Affinitätsmaterialien und Nanokristallen. biochemische und einzelmolekülspektroskopische Untersuchungen. *Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Breus, V. V., Heyes, C. D., Nienhaus, G. U. (2007) Quenching of CdSe-ZnS core-shell quantum dot luminescence by water-soluble thiolated ligands. *J. Phys. Chem. C*, 111, 18589–18594.

Brus, L. (1991) Quantum crystallites and nonlinear optics. *Appl. Phys. A*, 53, 465–474.

Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahimi, I. et al. (1987) A T5-promoter-based transcription-translation system for the analysis of protein expression *in vivo* and *in vitro*. *Methods Enzymol.*, 155, 416–433.

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

Canfield, D. E., Rosing, M. T., Bjerrum, C. (2006) Early anaerobic metabolisms. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.*, 361, 1819–1834.

Cao, Y. M., Bai, Y., Yu, Q. J., Cheng, Y. M., Liu, S., Shi, D. et al. (2009) Dye-sensitized solar cells with a high absorptivity Ruthenium sensitizer featuring a 2-(hexylthio)thiophene conjugated bipyridine. *J. Phys. Chem. C*, 113, 6290–6297.

Cardoso, M. B., Smolensky, D., Heller, W. T., O'Neill, H. (2009) Insight into the structure of light-harvesting complex II and its stabilization in detergent solution. *J. Phys. Chem. B*, 113, 16377–16383.

Cashmore, A. R. (1984) Structure and expression of a pea nuclear gene encoding a light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81, 2960–2964.

Chan, W. C. W., Maxwell, D. J., Gao, X., Bailey, R. E., Han, M., Nie, S. (2002) Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, 40–46.

Chan, W. C., Nie, S. M. (1998) Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 281, 2016–2018.

Chapin, D. M., Fuller, C. S., Pearson G.L. (1954) A new silicon p-n junction photocell for converting solar radiation into electrical power. *J. Appl. Phys.*, 25, 676–677.

Chen, D., Huang, F., Cheng, Y.-B., Caruso, R. A. (2009) Mesoporous anatase TiO₂ beads with high surface areas and controllable pore sizes: A superior candidate for high-performance dye-sensitized solar cells. *Adv. Mater.*, 21, 2206–2210.

Chen, H., Su, X., Neoh, K.-G., Choe, W.-S. (2008) Probing the interaction between peptides and metal oxides using point mutants of a TiO₂-binding peptide. *Langmuir*, 24, 6852–6857.

Chien, L. J., Lee, C. K. (2008) Biosilicification of dual-fusion enzyme immobilized on magnetic nanoparticle. *Biotechnology and Bioengineering*, 100, 223–230.

Christian, D. (2008) Mehrfachmarkierung von in vitro hergestellten LHCIIb-Trimeren mit einem SH-reaktiven Farbstoff. *Staatsexamensarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Clapp, A. R., Medintz, I. L., Mauro, J. M., Fisher, B. R., Bawendi, M. G., Mattoussi, H. (2004) Fluorescence resonance energy transfer between quantum dot donors and dye-labeled protein acceptors. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 301–310.

Cordes, K. (2010) Stabilisierung des LHCII durch Spermin-induzierte Kieselsäure-Co-Präzipitation. *Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Croce, R., Müller, M. G., Bassi, R., Holzwarth, A. R. (2001) Carotenoid-to-chlorophyll energy transfer in recombinant major light-harvesting complex (Lhc2) of higher plants. I. Femtosecond transient absorption measurements. *Biophys. J.*, 80, 901–915.

Croce, R., Weiss, S., Bassi, R. (1999) Carotenoid-binding sites of the major light-harvesting complex II of higher plants. *J. Biol. Chem.*, 274, 29613–29623.

Dabbousi, D. O., Rodrigues-Viejo, J., Mikulec, F. V., Heine, J. R., Mattoussi, H., Ober, R. et al. (1997) (CdSe)ZnS core-shell quantum dots: synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. *J. Phys. Chem. B*, 101, 9463–9475.

Das, R., Kiley, P., Segal, M., Norville, J., Yu, A., Wang, L. et al. (2004) Integration of photosynthetic protein molecular complexes in solid-state electronic devices. *Nano Lett.*, 4, 1079–1083.

Dawson, P. E., Churchill, M. J., Ghadiri, Kent, S. B. (1997) Modulation of reactivity in native chemical ligation through the use of thiol additives. *Journal of the American Chemical Society*, 119, 4325–4329.

Dawson, P. E., Kent, S. B. H. (2000) Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu. Rev. Biochem.*, 69, 923–960.

Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I., Kent, S. B. H. (1994) Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*, 266, 776–778.

Day, D., Ryrie, I., Fuad, N. (1984) Investigation of the role of the main light-harvesting chlorophyll-protein complex in thylakoid membranes. Reconstitution of depleted membranes. *J. Cell Biol.*, 97, 163–172.

Dekker, J. P., Boekema, E. J. (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1706, 12–39.

Dennis, A. M., Bao, G. (2008) Quantum dot-fluorescent protein pairs as novel fluorescence resonance energy transfer probes. *Nano Lett.*, 8, 1439–1445.

Dexter, D. L. (1953) A theory of sensitized luminescence in solids. *J. Chem. Phys.*, 21, 836–850.

Dietz, C. (2008) Konformationsuntersuchungen am rekombinanten LHCII mittels NMR- und EPR-Spektroskopie. *Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Dietzel, L., Bräutigam, K., Pfannschmidt, T. (2008) Photosynthetic acclimation: State transition and adjustment of photosystem stoichiometry - functional relationships between short-term and long-term light quality acclimation in plants. *FEBS J.*, 275, 1080–1088.

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

Dockter, C. (2009) Untersuchung der Struktur und Assemblierung des Lichtsammelkomplexes II höherer Pflanzen mittels elektronenparamagnetischer Resonanz (EPR). *Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Dockter, C., Volkov, A., Bauer, C., Polyhach, Y., Joly-Lopez, Z., Jeschke, G., Paulsen, H. (2009) Refolding of the integral membrane protein light-harvesting complex II monitored by pulse EPR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106, 18485–18490.

Duncan, T. V., Polanco, M. A., Kim, Y., Park, S. J. (2009) Improving the quantum yields of semiconductor quantum dots through photoenhancement assisted by reducing agents. *J. Phys. Chem. C*, 113, 7561–7566.

Eck, P. (2009) Synthese und Charakterisierung von Hybridkomplexen aus Halbleiter-Nanokristallen, dem Light Harvesting Complex II und organischem Farbstoff. *Staatsexamensarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Edvinsson, T., Li, C., Pschirer, N., Schöneboom, J., Eickemeyer, F., Sens, R. et al. (2007) Intramolecular charge-transfer tuning of perylenes: spectroscopic features and performance in dye-sensitized solar cells. *J. Phys. Chem. C*, 111, 15137–15140.

Edvinsson, T., Pschirer, N., Schöneboom, J., Eickemeyer, F., Boschloo, G., Hagfeldt, A. (2009) Photoinduced electron transfer from a terrylene dye to TiO₂: Quantification of band edge shift effects. *Chem. Phys.*, 357, 124–131.

Erker, W., Boggasch, S., Xie, R., Grundmann, G., Paulsen, H., Basché, T. (2009) Assemblies of semiconductor quantum dots and light-harvesting-complex II. *J. of Luminescence*. Online verfügbar unter 10.1016/j.jlumin.2009.12.002.

Fling, S. P., Gregerson, D. S. (1986) Peptide and peptide molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity Tris buffer system without Urea. *Analytical Biochemistry*, 155, 83–88.

Flynn, C. E., Mao, C., Hayhurst, A., Williams, J. L., Georgiou, G., Iverson, B., Belcher, A. M. (2003) Synthesis and organization of nanoscale II–VI semiconductor materials using evolved peptide specificity and viral capsid assembly. *J. Mater. Chem.*, 13, 2414–2421.

Förster, T. (1946) Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwiss.*, 33, 166–175.

Galvez, E. M., Zimmerman, B., Rombach-Riegraf, V., Bienert, R., Gräber, P. (2008) Fluorescence resonance energy transfer in single enzyme molecules with a quantum dot as donor. *Eur. Biophys. J.*, 37, 1367–1371.

Gauthier, M. A., Klok, H.-A. (2008) Peptide/protein-polymer conjugates: synthetic strategies and design concepts. *Chem. Comm.*, 2591–2611.

Gentle, I. E., Souza, D. P. de, Baca, M. (2004) Direct production of proteins with N-terminal cysteine for site-specific conjugation. *Bioconjugate Chem.*, 15, 658–663.

Georgakopoulou, S., van der Zwan, G., Bassi, R., van Grondelle, R., van Amerongen, H., Croce, R. (2007) Understanding the changes in the circular dichroism of light harvesting complex II upon varying its pigment composition and organization. *Biochemistry*, 46, 4745–4754.

Gerhards, C., Schulz-Drost, C., Sgobba, V., Guldi, D. M. (2008) Conjugating luminescent CdTe quantum dots with biomolecules. *J. Phys. Chem. B*, 112, 14482–14491.

Getz, E. B., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R., Selvin, P. R. (1999) A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. *Analytical Biochemistry*, 273, 73–80.

Gill, R., Zayats, M., Willner, I. (2008) Semiconductor quantum dots for bioanalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47, 7602–7625.

Goldman, E. R., Balighian, E. D., Mattousi, H., Kuno, M. K., Mauro, J. M., Tran, P. T., Anderson, G. P. (2002) Avidin: A natural bridge for quantum dot-antibody conjugates. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 6378–6382.

Goldsmith, C. R., Jaworski, J., Sheng, M., Lippard, S. J. (2006) Selective labeling of extracellular proteins containing polyhistidine sequences by a fluorescein - Nitrilotriacetic acid conjugate. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 418–419.

Goncalves, L. M., Bermudez, V. D., Ribeiro, H. A., Mendes, A. M. (2008) Dye-sensitized solar cells: A safe bet for the future. *Energy Environ. Sci.*, 1, 655–667.

Grabolle, M., Ziegler, J., Merkulov, A., Nann, T., Resch-Genger, U. (2008) Stability and fluorescence quantum yield of CdSe–ZnS quantum dots—Influence of the thickness of the ZnS shell. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1130, 235–241.

Gradinaru, C. C., van Stokkum, I. H. M., Pascal, A. A., van Grondelle, R., van Amerongen, H. (2000) Identifying the pathways of energy transfer between carotenoids and chlorophylls in LHCII and CP29. A multicolor, femtosecond pump-probe study. *J. Phys. Chem. B*, 104, 9330–9342.

Grätzel, M. (2009) Recent advances in sensitized mesoscopic solar cells. *Acc. Chem. Res.*, 42, 1788–1798.

- Green, M. A., Emery, K., Hishikawa, Y., Warta, W. (2009) Solar cell efficiency tables (Version 34). *Prog. Photovoltaics*, 17, 320–326.
- Guex, N., Peitsch, M. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18, 2714–2723.
- Gundlach, K., Werwie, M., Wiegand, S., Paulsen, H. (2009) Filling the "green gap" of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex by covalent attachment of Rhodamine Red. *Biochim. Biophys. Acta*, 1787, 1499–1504.
- Häcker, C. (2009) Wasserlösliche Nanokristalle - Untersuchung der Eigenschaften und Interaktion mit Pflanzenproteinen. *Staatsexamensarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Heinemann, B. (1999) Random mutations directed to trans-membrane and loop domains of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein: Impact on complex formation and pigment binding. *Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Heldt, H. W. (2003) Pflanzenbiochemie. 3. Aufl., Heidelberg, *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*.
- Hering, V. R., Gibson, G., Schumacher, R. I., Faljoni-Alario, A., Politi, M. J. (2007) Energy transfer between CdSe/ZnS core/shell quantum dots and fluorescent proteins. *Bioconjugate Chem.*, 18, 1705–1708.
- Herrmann, A., Müllen, K. (2006) From industrial colorants to single photon sources and biolabels: The fascination and function of rylene dyes. *Chem. Lett.*, 35, 978–985.
- Hines, M. A., Guyot-Sionnest, P. (1996) Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe nanocrystals. *J. Phys. Chem.*, 100, 468–471.
- Hippmann, A.-A. (2005) Overexpression of different silaffin fragments with hexahistidyl-tag. *Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Hirel, P. H., Schmitter, J.-M., Dessen, P., Fayat, G., Blanquet, S. (1989) Extent of N-terminal methionine excision from Escherichia coli proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86, 8247–8251.
- Hobe, S., Förster, R., Klingler, J., Paulsen, H. (1995) N-proximal sequence motif in light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein is essential for the trimerization of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *Biochemistry*, 34, 10224–10228.
- Hobe, S., Prytulla, S., Kühlbrandt, W., Paulsen, H. (1994) Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *EMBO J.*, 13, 3423–3429.
- Hobe, S., Trostmann, I., Raunser, S., Paulsen, H. (2006) Assembly of the major light-harvesting chlorophyll-*a/b* complex - thermodynamics and kinetics of neoxanthin binding. *J. Biol. Chem.*, 281, 25156–25166.
- Horn, R. (2004) Zeitaufgelöste Messung der Faltung und Pigmentbindung des Lichtsammelproteins LHCIIb anhand verschiedener spektroskopischer Monitore. *Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Horn, R., Grundmann, G., Paulsen, H. (2007) Consecutive binding of chlorophylls *a* and *b* during the assembly *in vitro* of light-harvesting chlorophyll-*a/b* protein (LHCIIb). *J. Mol. Biol.*, 366, 1045–1054.
- Horton, P., Johnson, M. P., Perez-Bueno, M. L., Kiss, A. Z., Ruban, A. V. (2008) Photosynthetic acclimation: Does the dynamic structure and macro-organisation of Photosystem II in higher plants grana membranes regulate light harvesting states. *FEBS J.*, 275, 1069–1079.

Huschenbett, C. (2001) Zugänglichkeit einzelner Domänen des Lichtsammelkomplexes LHCII: ein Vergleich zwischen Monomeren und Trimeren. *Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Jackowski, G., Kacprzak, K., Jansson, S. (2001) Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 heterotrimers of the main light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex of Photosystem II (LHC II). *Biochim. Biophys. Acta*, 1504, 340–345.

Jeschke, G., Bender, A., Schweikardt, T., Panek, G., Decker, H., Paulsen, H. (2005) Localization of the N-terminal domain in light-harvesting chlorophyll *a/b* protein (LHCIIb) by electron paramagnetic resonance (EPR) measurements. *J. Biol. Chem.*, 280, 18623–18630.

Jung, C., Müller, B. K., Lamb, D. C., Nolde, F., Müllen, K., Bräuchle, C. (2006) A new photostable terrylene diimide dye for applications in single molecule studies and membrane labeling. *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 5283–5291.

Kamat, P. V. (2008) Quantum dot solar cells. Semiconductor nanocrystals as light harvesters. *J. Phys. Chem. C*, 112, 18737–18753.

Kapanidis, A. N., Ebright, Y. W., Ebright, R. H. (2001) Site-specific incorporation of fluorescent probes into protein: Hexahistidine-tag-mediated fluorescent labeling with (Ni²⁺: Nitrilotriacetic acid)(n)-fluorochrome conjugates. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 12123–12125.

Kargul, J., Barber, J. (2008) Photosynthetic acclimation: Structural reorganisation of light harvesting antenna - role of redox-dependent phosphorylation of major and minor chlorophyll *a/b* binding proteins. *FEBS J.*, 275, 1056–1068.

Kay, A., Grätzel, M. (1993) Artificial photosynthesis. 1. Photosensitization of TiO₂ solar cells with chlorophyll derivatives and related natural porphyrins. *J. Phys. Chem.*, 97, 6272.

Khatoon, M. I. K., Pospisil, P., Yamashita, M., Lundin, B., Horie, J., Morita, N. et al. (2009) Quality control of Photosystem II. Thylakoid unstacking is necessary to avoid further damage to the D1 protein and to facilitate D1 degradation under light stress in spinach thylakoids. *J. Biol. Chem.*, 284, 25343–25352.

Kim, S., Fisher, B., Eisler, H. J., Bawendi, M. (2003) Type-II quantum dots: CdTe/CdSe(core/shell) and CdSe/ZnTe(core/shell) heterostructures. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 11466–11467.

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

Kosemund, K. (1999) Die Biogenese von Chlorophyll-*a/b*-bindenden Lichtsammelkomplexen: Topographie des Apoproteins bei der Thylakoidinsertion. *Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Kosemund, K., Geiger, I., Paulsen, H. (2000) Insertion of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein into the thylakoid - Topographical studies. *Eur. J. Biochem.*, 267, 1138–1145.

Köst, H.-P., Zweig, G. (1988) CRC Handbook of chromatography: Plant pigments. 9. Auflage, Boca Raton, CRC Press.

Kühlbrandt, W., Wang, D., Fujiyoshi, Y. (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature*, 367, 614–621.

Kuttkat, A., Hartmann, A., Hobe, S., Paulsen, H. (1996) The C-terminal domain of light-harvesting chlorophyll-*a/b*-binding protein is involved in the stabilisation of trimeric light-harvesting complex. *Eur. J. Biochem.*, 242, 288–292.

- Lämmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lata, S., Gavutis, M., Tampe, R., Piehler, J. (2006) Specific and stable fluorescence labeling of histidine-tagged proteins for dissecting multi-protein complex formation. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 2365–2372.
- Lee, S. W., Mao, C. B., Flynn, C. E., Belcher, A. M. (2002) Ordering of quantum dots using genetically engineered viruses. *Science*, 296, 892–895.
- Lee, Y. G., Jang, S. R., Vittal, R., Kim, K. J. (2007) Dinuclear Ru(II) dyes for improved performance of dye-sensitized TiO₂ solar cells. *New J. Chem.*, 31, 2120–2126.
- Liang, G.-X., Gu, M.-M., Zhang, J.-R., Zhu, J.-J. (2009) Preparation and bioapplication of high-quality, water-soluble, biocompatible, and near-infrared-emitting CdSeTe alloyed quantum dots. *Nanotechnology*, 20, 415103 (9pp).
- Lichtman, J. W., Concello, J. A. (2005) Fluorescence microscopy. *Nat. Methods*, 2, 910–919.
- Lion, M. (2001) Fluoreszenzfarbstoff-markierter Chlorophyll-*a/b*-Lichtsammlerkomplex: Energietransfer und Elektroneninjektion in einen Halbleiter. *Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Lion, M. (2005) Einzelmolekülspektroskopische Studien an Farbstoff-markierten Chlorophyll-*a/b*-Lichtsammlerkomplexen und Untersuchungen zur Integration der Komplexe in elektrochemische Solarzellen. *Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Liu, C., Zhang, Y., Cao, D., He, Y., Kuang, T., Yang, C. (2008) Structural and functional analysis of the antiparallel strands in the lumenal loop of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex of Photosystem II (LHCIIb) by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 283, 487–495.
- Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gul, L. et al. (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Ångstrom resolution. *Nature*, 428, 287–292.
- Luckarift, H. R., Spain, J. C., Naik, R. R., Stone, M. O. (2004) Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. *Nat. Biotechnol.*, 22, 211–213.
- Mädler, S., Bich, C., Touboul, D., Zenobi, R. (2009) Chemical cross-linking with NHS esters: a systematic study on amino acid reactivities. *J Mass Spectrom*, 44, 694–706.
- Margineanu, A., Hofkens, J., Cotlet, M., Habuchi, S., Stefan, A., Qu, J. et al. (2004) Photophysics of a water-soluble rylene dye: Comparison with other fluorescecent molecules for biological applications. *J. Phys. Chem. B*, 108, 12242–12251.
- Martinson, T., Plumley, F. (1995) One-step extraction and concentration of pigments and acyl lipids by sec-butanol from *in vitro* and *in vivo* samples. *Anal. Biochem.*, 228, 123–130.
- Mattousi, H., Mauro, J. M., Goldman, E. R., Anderson, G. P., Sundar, V. C., Mikulec, F. V., Bawendi, M. G. (2000) Self-assembly of CdSe–ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 12142–12150.
- Matyildsky, V. V., Dworak, L., Breus, V. V., Basché, T., Wachtveitl, J. (2009) Ultrafast charge separation in multiexcited CdSe quantum dots mediated by adsorbed electron acceptors. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 2424–2425.
- Medintz, I. L., Clapp, A. R., Mattousi, H., Goldman, E. R., Fisher, B., Mauro, J. M. (2003) Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors. *Nature materials*, 2, 630–638.
- Medintz, I. L., Konnert, J. H., Clapp, A. R., Stanish, I., Twigg, M. E., Mattoussi, H. et al. (2004) A fluorescence resonance energy transfer-derived structure of a quantum dot-protein bioconjugate nanoassembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, 9612–9617.

- Medintz, I. L., Mattoussi, H. (2009) Quantum dot-based resonance energy transfer and its growing application in biology. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 11, 17–45.
- Medintz, I. L., Pons, T., Susumu, K., Boeneman, K., Dennis, A. M., Farrell, D. et al. (2009) Resonance energy transfer between luminescent quantum dots and diverse fluorescent protein acceptors. *J. Phys. Chem. C*, 113, 18552–18561.
- Medintz, I. L., Sapsford, K. E., Clapp, A. R., Pons, T., Higashiya, S., Welch, J. T., Mattoussi, H. (2006) Designer variable repeat length polypeptides as scaffolds for surface immobilization of quantum dots. *J. Phys. Chem. B*, 110, 10683–10690.
- Miller, B. T., Collins, T. J., Rogers, M. E., Kurosky, A. (1997) Peptide biotinylation with amine-reactive esters: differential side chain reactivity. *Peptides*, 18, 1585–1595.
- Miller, J. N. (2005) Fluorescence energy transfer methods in bioanalysis. *Analyst*, 130, 265–270.
- Mora-Sero, I., Gimenez, S., Fabregat-Santiago, F., Gomez, R., Shen, Q., Toyoda, T., Bisquert, J. (2009) Recombination in quantum dot sensitized solar cells. *Acc. Chem. Res.*, 42, 1848–1857.
- Müller, A. (2008) Strukturelle Charakterisierung des N-Terminus des LHCII durch EPR und Untersuchung des Einflusses der Phosphorylierung auf die Konformation. *Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Müller, P., Li, X., Niyogi, K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.*, 125, 1558–1566.
- Nazeeruddin, M., Kay, A., Rodicio, I., Humphry-Baker, R., Müller, E., Liska, P. et al. (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.
- Nishio, J. N. (2000) Why are higher plants green? Evolution of the higher plant photosynthetic pigment complement. *Plant Cell Environ.*, 23, 539–548.
- Nußberger, S., Dörr, K., Wang, D., Kühlbrandt, W. (1993) Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *J. Mol. Biol.*, 234, 347–356.
- Odobel, F., Zabri, H. (2005) Preparations and characterizations of bichromophoric systems composed of a Ruthenium polypyridine complex connected to a difluoroborazaindacene or a Zinc phthalocyanine chromophore. *Inorg. Chem.*, 44, 5600–5611.
- Oehls, B. (2009) Herstellung von LHCII-Silaffin-Hybridkomplexen. *Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Ooyama, Y., Harima, Y. (2009) Molecular designs and syntheses of organic dyes for dye-sensitized solar cells. *Eur. J. Org. Chem.*, 2903–2934.
- O'Regan, B., Grätzel, M. (1991) A low-cost, high-efficiency solar cell based on dye-sensitized colloidal TiO₂ films. *Nature*, 353, 737–740.
- Paulsen, H., Finkenzeller, B., Kühlein, N. (1993) Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein. *Eur. J. Biochem.*, 215, 809–816.
- Paulsen, H., Rümmler, U., Rüdiger, W. (1990) Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein overexpressed in *E. coli*. *Planta*, 181, 204–211.
- Peneva, K., Mihov, G. M., Nolde, F., Rocha, S., Hotta, J.-i., Braeckmans, K. et al. (2008a) Water-soluble monofunctional perylene and terrylene dyes: Powerful labels for single-enzyme tracking. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47, 3372–3375.

Peneva, K., Mihov, G., Herrmann, A., Zarrabi, N., Börsch, M., Duncan, T., Müllen, K. (2008b) Exploiting the nitrilotriacetic acid moiety for biolabeling with ultrastable perylene dyes. *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 5398–5399.

Peng, X. G., Manna, L., Yang, W. D., Wickham, J., Scher, E., Kadavanich, A., Alivisatos, A. P. (2000) Shape control of CdSe nanocrystals. *Nature*, 404, 59–61.

Peter, G., Thornber, J. (1991) Electrophoretic procedures for fractionation of Photosystems I and II pigment proteins of higher plants and for determination of their subunit composition. *Methods in Plant Biochemistry*, 5, 195–210.

Plumley, F., Schmidt, G. (1987) Reconstitution of chlorophyll *a/b* light-harvesting complexes: Xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84, 146–150.

Plunger, M. (2007) Herstellung heterogener Trimere des rekombinanten Lichtsammelproteins (LHCII). *Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Pons, T., Medintz, I. L., Sapsford, K. E., Higashiya, S., Grimes, A. F., English, D. S., Mattoussi, H. (2007) On the quenching of semiconductor quantum dot photoluminescence by proximal gold nanoparticles. *Nano Lett.*, 7, 3157–3164.

Porra, R., Thompson, W., Kriedemann, P. (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.

Qu, J., Kohl, C., Pottek, M., Müllen, K. (2004) Ionic Perylenetetracarboxydiimides: Highly fluorescent and water-soluble dyes for biolabeling. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, 1528–1531.

Razinkov, V., Sorokin, E., Bobylev, G., Molotkovsky, J. (1994) Rhodamine lipid derivatives increase the light-harvesting ability of isolated chloroplasts. *Biol. Membrany*, 11, 660–663.

Röger, C., Müller, M. G., Lysetska, M., Holzwarth, A. R., Würthner, F. (2006) Efficient energy transfer from peripheral chromophores to the self-assembled zinc chlorin rod antenna: A bioinspired light-harvesting system to bridge the "green gap". *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 6542–6543.

Rogl, H., Kosemund, K., Kühlbrandt, W., Collinson, I. (1998) Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. *FEBS Lett.*, 432, 21–26.

Roos, C. (2008) Klonierung und Charakterisierung von Silaffin-ähnlichen Proteinen. *Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74, 5463–5467.

Sapsford, K. E., Berti, L., Medintz, I. L. (2006) Materials for fluorescence resonance energy transfer analysis: Beyond traditional donor-acceptor combinations. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, 4562–4588.

Sapsford, K. E., Pons, T., Medintz, I. L., Higashiya, S., Brunel, F. M., Dawson, P. E., Mattoussi, H. (2007) Kinetics of metal-affinity driven self-assembly between proteins or peptides and CdSe-ZnS quantum dots. *J. Phys. Chem. C*, 111, 11528–11538.

Sauer, K., Scheer, H., Sauer, P. (1987) Förster transfer calculations based on crystal structure data from *Agmenellum quadruplicatum* C-phycocyanin. *Photochem. Photobiol.*, 46, 427–440.

- Schägger, H., Jagow, G. von (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 166, 368–379.
- Schmid, V. H. R. (2008) Light-harvesting complexes of vascular plants. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65, 3619–3639.
- Schuler, B., Pannell, L. K. (2002) Specific labeling of polypeptides at amino-terminal cysteine residues using Cy5-benzyl thioester. *Bioconjugate Chem.*, 13, 1039–1043.
- Seely, G., Conolly, J. (1986) Light emission by plant and bacteria, Orlando, USA, *Academic Press*.
- Shafer, D. E., Inman, J. K., Lees, A. (2000) Reaction of tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) with maleimide and alpha-haloacyl groups: Anomalous elution of TCEP by gel filtration. *Anal. Biochem.*, 282, 161–164.
- Shao, L., Dong, C., Sang, F., Qian, H., Ren, J. (2009) Studies on interaction of CdTe quantum dots with bovine serum albumin using fluorescence correlation spectroscopy. *J. Fluoresc.*, 19, 151–157.
- Siegers, C., Würfel, U., Zistler, W., Gores, H., Hohl-Ebinger, J. et al. (2008) Overcoming kinetic limitations of electron injection in the dye solar cell via coadsorption and FRET. *ChemPhysChem*, 9, 793–798.
- Smith, A. W., Nie, S. (2010) Semiconductor nanocrystals: structure, properties, and band gap engineering. *Acc. Chem. Res.*, 43, 190–200.
- Sperling, R. A., Parak, W. J. (2010) Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Phil. Trans. R. Soc. A*, 368, 1333–1383.
- Standfuss, J., Kühlbrandt, W. (2004) The three isoforms of the light-harvesting complex II - Spectroscopic features, trimer formation, and functional roles. *J. Biol. Chem.*, 279, 36884–36891.
- Standfuss, R., van Scheltinga, A. C. T., Lamborghini, M., Kühlbrandt, W. (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO J.*, 24, 919–928.
- Storf, S. (2001) Ortsspezifische Markierung hydrophiler Bereiche des rekombinanten Chlorophyll-a/b-Lichtsammlerkomplexes (LHCII): Unterschiede in Monomer und Trimer. *Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Suemori, Y., Nagata, M., Nakamura, Y., Nkagawa, K., Okuda, A., Inagaki, J.-i. et al. (2006) Self-assembled monolayer of light-harvesting core complexes of photosynthetic bacteria on an amino-terminated ITO electrode. *Photosynth. Res.*, 90, 17–21.
- Sun, Z., Cheng, Y., Lechmann, M., Li, J., Li, J., Wu, J. et al. (2009) Exciton diffusion controlled quantum efficiency in hybrid dye sensitized solar cells. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 11, 1604–1609.
- T**ang, T., Peneva, K., Müllen, K., Webber, S. E. (2007) Photophysics of water soluble perylene diimides in surfactant solutions. *J. Phys. Chem. A*, 111, 10609–10614.
- Terashima, I., Fujita Takashi, Inoue, T., Chow, W. S., Oguchi, R. (2009) Green light drives leaf photosynthesis more efficiently than red light in strong white light: Revisiting the enigmatic question of why leaves are green. *Plant Cell Physiol.*, 50, 684–697.
- Topoglidis, E., Campbell, C., Cass, A., Durrant, J. (2001) Factors that affect protein adsorption on nanostructured titania films. A novel spectroelectrochemical application to sensing. *Langmuir*, 17, 7899–7906.

- V**illain, M., Vizzavona, J., Rose, K. (2001) Covalent capture: a new tool for the purification of synthetic and recombinant polypeptides. *Chem. Biol.*, 8, 673–679.
- Volkov, A., Dockter, C., Bund, T., Paulsen, H., Jeschke, G. (2009) Pulsed EPR determination of water accessibility to spin-labeled amino acid residues in LHCIIb. *Biophys. J.*, 96, 1124–1141.
- W**erwie, M. (2009) Markierung von LHCII-Mehrfachcysteinmutanten mit Donorfarbstoffen. *Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Whaley, S. R., English, D. S., Hu, E. L., Barbara, P. F., Belcher, A. M. (2000) Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly. *Nature*, 405, 665–668.
- Wiegand, S. (2008) Herstellung von Mehrfach-Cystein-Mutanten des Light Harvesting Complex II und ihre Markierung mit SH-reaktivem Farbstoff. *Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Wolf, H. (1998) Die Erstellung eines gereinigten, selektiv N-terminal Cyaninfarbstoff-markierten, rekombinanten Lichtsammlerproteins. *Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Wolf-Klein, H. (2001) Biomimetisches Modell eines Photosystems aus dem pflanzlichen Photosyntheseapparat. Energietransfermessungen und Einzelmolekülspektroskopie an Fluoreszenzfarbstoffmarkiertem rekombinantem Lichtsammlerkomplex. *Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Wolf-Klein, H., Kohl, C., Müllen, K., Paulsen, H. (2002) Biomimetic model of a plant photosystem consisting of a recombinant light-harvesting complex and a terrylene dye. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41, 3378–3380.
- X**ie, R. G., Kolb, U., Li, J. X., Basche, T., Mews, A. (2005a) Synthesis and characterization of highly luminescent CdSe-core CdS/Zn_{0.5}Cd_{0.5}S/ZnS multishell nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 7480–7488.
- Xie, R. G., Zhong, X. H., Basche, T. (2005b) Synthesis, characterization, and spectroscopy of type-II core/shell semiconductor nanocrystals with ZnTe cores. *Adv. Mater.*, 17, 2741–2745.
- Y**ang, C. H., Boggasch, S., Haase, W., Paulsen, H. (2006) Thermal stability of trimeric light-harvesting chlorophyll *a/b* complex (LHCIIb) in liposomes of thylakoid lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1757, 1642–1648.
- Yang, C., Horn, R., Paulsen, H. (2003) The light-harvesting chlorophyll *a/b* complex can be reconstituted in vitro from its completely unfolded apoprotein. *Biochemistry*, 42, 4527–4533.
- Yang, C., Lambrev, P., Chen, Z., Javorfi, T., Kiss, A. Z., Paulsen, H., Garab, G. (2008) The negatively charged amino acids in the lumenal loop influence the pigment binding and conformation of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex of Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1777, 1463–1470.
- Zhang, Q. F., Dandeneau, C. S., Zhou, X. Y., Cao, G. Z. (2009) ZnO nanostructures for dye-sensitized solar cells. *Adv. Mater.*, 21, 4087–4108.
- Zhao, J. H., Wang, A. H., Green, M. A., Ferrazza, F. (1998) 19.8% efficient "honeycomb" textured multicrystalline and 24.4% monocrystalline silicon solar cells. *Appl. Phys. Lett.*, 73, 1991–1993.
- Zheng, Y., Yang, Z., Li, Y., Ying, J. Y. (2008) From glutathione capping to a crosslinked, phytochelatin-like coating of quantum dots. *Adv. Mater.*, 20, 3410–3415.

VII Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bodipy-IAA	Bodipy-Iodacetamid
BTI	Benzoyl-Terrylene-Dicarboximid
Cap	Chloramphenicol
CD	„Circular dichroism“ (Zirkulardichroismus)
CHAPS	3-[(3-Chloramidopropyl)-diethylammonio]-1-propanesulfonat
Chl <i>a</i>	Chlorophyll <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Chlorophyll <i>b</i>
CP	Chlorophyllprotein
DHLA	„Dihydrolipoic acid“ (Dihydroliponsäure)
dH₂O	destilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
DNQDI	Dinaphthalen-Quaterlylen-Diimid-Maleimid
dNTP	2'-Desoxynukleotid
DPA	D-Penicillamin
DSSC	„Dye-sensitized solar cells“ (elektrochemische Farbstoff-Solarzelle)
DTT	Dithiothreitol
DY731	DY731-Maleimid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidium Bromid
FPLC	„Fast performance liquid chromatography“
FRET	Fluoreszenz/Förster-Resonanzenergietransfer
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
HPLC	„High performance liquid chromatography“
„His₆-Tag“	Hexahistidyl-Rest
IB	„Inclusion bodies“ (Einschlusskörperchen)
IDA	„Iminodiacetic acid“ (Iminodiessigsäure)
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktosid
IR	Infrarot
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LHCII	„Light harvesting complex II“ (Lichtsammelkomplex II)
LHCP	Apoprotein des LHCII
LM	Laurylmaltosid (n-Dodecyl-β-D-Maltosid)
Lu	Lutein
Mal	Maleimid
MMTS	Methylmethanethiosulfonat
β-ME	β-Mercaptoethanol

NADP(H)	Nicotinamid-Adenindinucleotid-phosphat (reduziert)
NaP	Natriumphosphat
NEB	„New England Biolabs“
NHS	N-Succinimidylester
NIR	„Near infra red“
NPQ	„Non photochemical quenching“ (Nicht-photochemische Energielöschung)
NTA	„Nitrilo acetic acid“ (Nitriloessigsäure)
Nx	Neoxanthin
OG	Octylglucosid (n-Octyl-β-D-Glucopyranosid)
p.A.	„pro analysis“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PA-Gel	Polyacrylamid-Gel
PCR	„Polymerase chain reaction“ (Polymerasekettenreaktion)
PDI-Mal	wasserlösliches Perylen-Diimid-Maleimid
PDI-NHS	wasserlösliches Perylen-Diimid-N-Succinimidylester
PDI-NTA	wasserlösliches Perylen-Diimid-Nitriloessigsäure
PDI-TE	wasserlösliches Perylen-Diimid-Thioester
PG	Dipalmitoyl-Phosphatidylglycerin
PSI/II	Photosystem I/II
QD	„Quantum dot“
qE	„energy dependant quenching“ (schnellste Komponente des NPQ)
R₀	Försterradius
Rho-Mal	Rhodamin-Maleimid
Rho-NHS	Rhodamin-N-Succinimidylester
SDS	„Sodium dodecyl sulfate“ (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SV	Säulenvolumen
TCaEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphin
TCyEP	Tris-(2-cyanoethyl)phosphin
TDI-Mal	wasserlösliches Terrylen-Diimid-Maleimid
TDI-nf	nicht funktionalisiertes wasserlösliches Terrylen-Diimid
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylmethyldiamin
TMIMA	Terrylen-Monoimid-Monoanhydrid-Maleimid
TOPO	Trioctylphosphinoxid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TX	Triton X-100
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	„volume per volume“ (Volumenprozent)
WSCP	Wasserlösliches Chlorophyllprotein, <i>hier</i> : mBoWSCP _{His} (Bektas, 2010)
w/v	„weight per volume“ (Gewichtsprozent)

2 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

2.1 Sequenz von D7f3 (Dilly-Hartwig et al., 1998)

Dargestellt ist die Nukleotid- und die Aminosäuresequenz (grau unterlegt) des murenen LHCII im pDS12-RBSII-Vektor. Zusätzlich sind noch die Positionen der in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme (fett) und Sequenzierungsprimer (kursiv) dargestellt.

	XhoI	DS23+ ->	
1	CTCGAG AAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGA		56
		EcoRI	
57	TTCAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGA GAATTC ATTAAAGAGGAGAAATTAAGCAT		112
		M	
113	G~CGTAAATCTGCTACCACCAAGAAAGTAGCGAGCTCTGGAAGCCCATGGTACGGACCAG		171
1	R K S A T T K K V A S S G S P W Y G P		19
172	ACCGTGTTAAGTACTTAGGCCATTCTCCGGTGAGTCTCCATCCTACTTGACTGGAGAGT		231
20	D R V K Y L G P F S G E S P S Y L T G E		39
232	TCCCCGGTGACTACGGTTGGGACACTGCCGGACTCTCTGCTGACCCAGAGACATTCTCCA		291
40	F P G D Y G W D T A G L S A D P E T F S		59
292	AGAACCGTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCTATGTTGGGTGCTTTGGGATGTG		351
60	K N R E L E V I H S R W A M L G A L G C		79
352	TCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTTAAATTCGCGCAAGCTGTGTGGTTCAAGG		411
80	V F P E L L S R N G V K F G E A V W F K		99
412	CAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTACTTGGGCAACCCAAGCTTGGTCC		471
100	A G S Q I F S E G G L D Y L G N P S L V		119
472	ATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTTATCTTGATGGGAGCTGTGCAAG		531
120	H A Q S I L A I W A T Q V I L M G A V E		139
532	GTTACCGTATTGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTTGATCCACTTTACCCAGGTGGAA		591
140	G Y R I A G G P L G E V V D P L Y P G G		159
592	GCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCATTCGCAGAATTGAAGGTGAAGG		651
160	S F D P L G L A D D P E A F A E L K V K		179
652	AACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTTGGATTCTTCGTTCAAGCTATTG		711
180	E L K N G R L A M F S M F G F F V Q A I		199
712	TAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGATCATCTTGCAGACCCAGTCAACAACA		771
200	V T G K G P L E N L A D H L A D P V N N		219
772	ATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTTCCCGGAAAATAA~ACACTCTTATATTTATAT		830
220	N A W S Y A T N F V P G K *		232
831	GTTTTTGTGATAGTAATCTTCTTCCCAATTCAATGTGAATTATTATCATTATCATTATC		890
902	Seq105-	962 PstI	998 DS178-
			1943 XbaI

2.2 Sequenzen der neuen LHCII-Klone

In dieser Arbeit wurden vier neue LHCII-Klone hergestellt. Die hier dargestellten Sequenzabschnitte geben die jeweiligen Veränderungen in Bezug auf D7f3 wieder. Die ausgetauschten oder neuen Nukleotide und Aminosäuren sind dabei unterstrichen. Zusätzlich sind Molekulargewicht und Extinktionskoeffizienten, wie sie vom „Peptide Property Calculator“ (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html#helpexco>) berechnet wurden, angegeben.

R1Ch

111	ATG	<u>TGT</u>	AAA	119
0	M	<u>C</u>	K	2

807	AAA	<u>CAC</u>	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	TAA	CCC	GGG	<u>AAA</u>	TAA	812/842
232	K	<u>H</u>	H	H	H	H	H	*					232/238

A7-N

Molekulargewicht: 26 290 g/mol

Extinktionskoeffizient (280 nm): 44740 cm⁻¹M⁻¹

111	ATG	<u>TGC</u>	AAC	AAT	<u>CCG</u>	ATG	CAC	CAA	AAT	<u>TGT</u>	GGA	GGA	<u>AGT</u>	CGT	116/152
0	M	<u>C</u>	N	N	<u>P</u>	M	H	Q	N	<u>C</u>	G	G	<u>S</u>	R	1/ 13

Z8-N

Molekulargewicht: 26 600 g/mol

Extinktionskoeffizient (280 nm): 44500 cm⁻¹M⁻¹

111	ATG	<u>GTC</u>	ATC	AGC	AAT	CAT	GCC	GAA	AGC	AGT	CGT	CGT	TTA	GGC	113/152
0	M	<u>V</u>	I	S	N	H	A	E	S	S	R	R	L	G	0/ 13

114/153	<u>GGA</u>	<u>AGT</u>	CGT	116/161
1/ 14	G	S	R	1/ 16

Z8-C

Molekulargewicht: 26 600 g/mol

Extinktionskoeffizient (280 nm): 44500 cm⁻¹M⁻¹

807	AAA	<u>GTG</u>	ATC	AGC	AAT	CAT	GCC	GAA	AGC	AGC	CGT	CGT	CTG	GGA	809/848
232	K	<u>G</u>	G	S	V	I	S	N	H	A	E	S	S	R	232/245

810/849	<u>GGA</u>	<u>AGC</u>	TAA	812/857
232/246	R	L	*	232/247