

Biologischer Lichtsammler (LHCII) für Halbleiternanokristalle (Quantum Dots)

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Mara Werwie

geb. am 14. September 1982 in Bad Schwalbach

Mainz, 2012

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2013

1. Einleitung.....	1
1.1 Umwandlung von Lichtenergie in der Photosynthese	1
1.2 Light-harvesting complex II (LHCII)	1
1.2.1 LHCII in vivo	1
1.2.2 Struktur des LHCII.....	3
1.2.3 LHCII in vitro	4
1.3 Solarzellen.....	5
1.3.1 Dye-Sensitized Solar Cells (DSSCs).....	6
1.3.2 Biologische Komponenten in Solarzellen	7
1.4 Energietransfer	8
1.4.1 Grundlagen	8
1.4.2 Energietransfer-Partner für den LHCII	9
1.4.2.1 Quantum Dots (QDs).....	10
1.4.2.2 Fluoreszenzfarbstoffe	11
1.4.2.3 Lanthanoide	12
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Geräte.....	14
2.2 Material	16
2.2.1 Chemikalien.....	16
2.2.2 Längenstandards	17
2.2.3 Bakterienstämme.....	17
2.2.4 Vektoren	18
2.2.5 Verwendete LHCII-Varianten	18
2.2.6 Farbstoffe.....	20
2.2.7 Quantum Dots	21
2.2.8 Methylviologen.....	22
2.3 Molekularbiologische Methoden	22
2.3.1 Nährmedien und Platten	22
2.3.2 Vereinzeln von Bakterienkolonien, Übernachtskulturen und Dauerkulturen.....	23
2.3.3 Plasmid-Isolation	23
2.3.4 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	24
2.3.5 Mutagenesen	24
2.3.5.1 Einfügen einer His ₆ -Tag codierenden Sequenz Hilfe des Site directed Mutagenesis Kit (Finnzymes)	25
2.3.5.2 Austausch einzelner Basen mit Hilfe des QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies).....	26
2.3.6 Transformation.....	27
2.3.6.1 Transformation in DH5α	27
2.3.6.2 Transformation in JM 101	27
2.3.6.3 Transformation in Rosetta	27
2.3.6.4 Ausplattieren von transformierten Bakterienkulturen	28
2.3.7 Sequenzierung.....	28
2.4 Präparativ biochemische Methoden.....	29

2.4.1	Pigmentextraktion aus <i>Pisum Sativum</i>	29
2.4.2	Überexpression und Isolation von LHCII-Apoprotein.....	30
2.4.3	Detergenzwechselrekonstitution des LHCII-Apoproteins.....	31
2.4.4	Trimerisierung von His ₆ -Tag-tragenden LHCII-Monomeren über Affinitätschromatographie.....	32
2.4.5	Trimerisierung von His ₆ -Tag-freien LHCII-Monomeren durch Integration in Liposomen.....	32
2.4.6	Aufreinigung von LHCII-Komplexen über Ultrazentrifugation.....	33
2.4.7	Aufkonzentrierung und Pufferaustausch von LHCII- oder QD-Lösungen.....	33
2.4.8	LHCII-Farbstoff-Hybridkomplexe.....	34
2.4.8.1	Markierung von LHCII-Apoprotein mit Maleimid-funktionalisierten Fluoreszenzfarbstoffen.....	34
2.4.8.2	Markierung von LHCII-Trimeren mit Lanthanoid-Maleimiden.....	35
2.4.8.3	Markierung von LHCII-Trimeren mit Europium.....	35
2.4.9	LHCII-QD-Hybridkomplexe.....	36
2.4.9.1	Herstellung von LHCII-QD-Hybridkomplexen.....	36
2.4.9.2	Ultrazentrifugationsversuche mit LHCII-QD-Hybridkomplexen.....	36
2.4.10	Nachweis einer Ladungstrennung in QDs mit Methylviologen.....	37
2.4.10.1	Entgasen von wässrigen Lösungen.....	37
2.4.10.2	Entfernung von Sauerstoff in wässrigen Lösungen durch Glucose-Oxidase und Katalase.....	38
2.4.10.3	Optimierter Methylviologen-Ansatz mit Enzym-Mix.....	38
2.4.11	TiO ₂ -Platten.....	39
2.4.11.1	Herstellung von TiO ₂ -Platten.....	39
2.4.11.2	Adsorption von LHCII-Hybrid-Komplexen auf TiO ₂ -Platten.....	39
2.4.11.3	Spektroskopische Untersuchung der TiO ₂ -Platten.....	40
2.4.11.4	Versuche zur Integration von LHCII in Hcp1.....	40
2.5	Analytisch biochemische Methoden.....	41
2.5.1	Pigmentanalyse mittels HPLC.....	41
2.5.2	Gelelektrophorese.....	41
2.5.2.1	Herstellung von Polyacrylamidgelen.....	42
2.5.2.2	Denaturierende SDS-PAGE.....	42
2.5.2.3	Schwach denaturierende Gelelektrophorese.....	43
2.5.2.4	Proteinfärbung mit Coomassie.....	43
2.6	Analytisch spektroskopische Methoden.....	44
2.6.1	Absorptionsspektroskopie.....	44
2.6.1.1	Allgemeine Konzentrationsbestimmung über den Extinktionskoeffizienten...	44
2.6.1.2	Bestimmung des Chlorophyllgehalts von Pigmentextrakt.....	45
2.6.1.3	Konzentrationsbestimmung von LHCII-Apoprotein.....	45
2.6.2	Fluoreszenzspektroskopie.....	46
2.6.2.1	Überprüfung der LHCII-Faltung und Energietransfer-Messungen.....	46
2.6.2.2	Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen.....	47
2.6.2.3	Lumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (LRET)-Messungen.....	47
2.6.3	Circular-Dichroismus-Spektroskopie.....	48
2.7	FRET-Berechnungen.....	48
2.7.1	Dekonvolution von Fluoreszenzspektren.....	48

2.7.2	Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten	48
2.7.3	Berechnung von Försterradien.....	49
2.7.4	Bestimmung des zu erwartenden Energietransfers	50
2.7.5	Berechnung der Energietransfereffizienz	50
2.7.6	Bestimmung der FRET-Plausibilität	51
2.8	Bestimmung von apparenten Bindekonstanten	51
3.	Ergebnisse.....	53
3.1	Stabilisierung der Fluoreszenz von Typ-I QDs in wässriger Lösung	53
3.1.1	Einsatz von Reduktionsmitteln	54
3.1.2	Variation der Pufferzusammensetzung.....	56
3.1.3	Analyse des Einflusses von TCaEP auf die QD-Fluoreszenz.....	58
3.2	Stabilisierung der Typ-II QD-Fluoreszenz in wässriger Lösung.....	59
3.2.1	Typ-II QDs mit DHLA-Liganden	59
3.2.2	Typ-II QDs mit MPA-Liganden	61
3.3	Vorarbeiten für die Herstellung von Hybrid-Konstrukten mit LHCII	61
3.3.1	Herstellung und Charakterisierung von LHCII-Trimeren	61
3.3.2	Wiederaufbereitung von aggregierten QDs	63
3.4	Hybridkomplexe aus LHCII und Typ-I QD	64
3.4.1	Energietransfer zwischen Typ-I QDs und LHCII in Standardpuffer	64
3.4.2	Energietransfer zwischen Typ-I QDs und LHCII in Tris/HCl-Puffer.....	69
3.4.3	Energietransfer zwischen Typ-I QDs und verschiedenen LHCII-Varianten im Vergleich	70
3.4.4	Bestimmung des zu erwartenden Energietransfers zwischen Typ-I QDs und LHCII	72
3.5	Hybridkomplexe aus LHCII und Typ-II QDs	73
3.5.1	FRET zwischen LHCII und Typ-II QDs. Publikation I: Bio Serves Nano: Biological Light-Harvesting Complex as Energy Donor for Semiconductor Quantum Dots, Langmuir 2012, 28, 5810-5818	74
3.5.2	FRET - Ein Vergleich von DHLA-QDs und MPA-QDs.....	101
3.5.3	FRET zwischen LHCII-Cysteinmutanten und Typ-II QDs.....	102
3.5.4	Vergleich von Quantum Dot bindenden Proteinsequenzen - Untersuchung der Affinität mit Hilfe von Ultrazentrifugation und FRET. Publikation II: Comparison of Quantum Dot-binding Protein Tags - Affinity Determination by Ultracentrifugation and FRET [in Bearbeitung]	104
3.5.5	Energietransfer-Effizienz zwischen Typ-II QDs und verschiedenen LHCII-Varianten	117
3.6	Triaden - Hybridkomplexe aus LHCII, Farbstoffen und Quantum Dots	118
3.7	Nachweis einer LHCII sensibilisierten Ladungstrennung in Typ-II QDs mit Hilfe des Elektronenakzeptors Methylviologen	120
3.7.1	Optimierung der Probenzusammensetzung	120
3.7.2	Entfernung des Sauerstoffs durch Entgasen	122
3.7.3	Entfernung des Sauerstoffs durch Enzym-Mix aus Oxidase und Katalase....	124
3.8	Integration von LHCII-Hybridkomplexen in Solarzellen	129
3.8.1	LHCII-Adsorption auf TiO ₂ -Platten	129

3.8.2	LHCII-Farbstoff-Komplexe auf TiO ₂ -Platten.....	132
3.8.3	LHCII-QD-Komplexe auf TiO ₂ -Platten	134
3.9	Einschluss von LHCII in das Ringprotein Hcp1	135
3.10	LHCII und Lanthanoide	138
3.10.1	Energietransfer zwischen Lanthanoid-bindenden, Maleimid-funktionalisierten Strukturen und LHCII	139
3.10.2	Energietransfer zwischen Lanthanoiden und LHCII mit einer Lanthanoid- Affinitätssequenz	140
4.	Diskussion.....	143
4.1	Quantum Dots.....	143
4.1.1	TCaEP interagiert mit der QD-Oberfläche und stabilisiert die QD-Emission.....	143
4.1.2	Die Zukunft von TCaEP in QD-Versuchen.....	145
4.1.3	Auswahl des Puffers ist entscheidend für das Arbeiten mit QDs	147
4.2	LHCII-QD Hybridkomplexe	149
4.2.1	Fluoreszenzlöschung in Typ-I QD/LHCII-Hybrid-Komplexen hat mehrere Ursachen.....	149
4.2.2	FRET-Betrachtungen zwischen Typ-I QDs und „alten“ LHCII-Varianten können nicht zur Analyse von Bindeaffinitäten herangezogen werden	152
4.2.3	Ligandengröße hat Einfluss auf FRET zwischen LHCII und Typ-II QDs	152
4.2.4	Cysteine im LHCII vermitteln Bindung an ZnS-Oberfläche von QDs	153
4.2.5	Ermittelter Försterradius für LHCII und Typ-II QDs liefert plausible Daten	156
4.3	Triaden aus LHCII, Farbstoff und Typ-II Quantum Dots	161
4.3.1	Transferieren QDs Elektronen auf LHCII-gebundene Farbstoffe?	161
4.3.2	Rho ₅₆₀ -Mal und Typ-II QDs – Nachweis für einen Elektronentransfer durch die Nanopartikel?	162
4.4	LHCII sensibilisierte Ladungstrennung	166
4.4.1	Methylviologen eignet sich bedingt zum Nachweis der Ladungstrennung in QDs	166
4.4.2	LHCII-Adsorption auf TiO ₂ -Platten optimiert.....	169
4.4.3	LHCII-TDI _{GS} - bzw. LHCII-QD-Konstrukte geeignet für Solarzellen?	170
4.5	LHCII kann in detergentfreien Lösungen durch wasserlösliche Proteine stabilisiert werden - kein Einbau des LHCII in Ringprotein Hcp1.....	172
4.6	LHCII und Lanthanoide	173
4.6.1	Lanthanoid-Maleimide können Anregungsenergie auf LHCII übertragen....	173
4.6.2	LBT am LHCII führt zu spezifischer Markierung mit Europium, begleitet von einem effektiven Energietransfer	174
5.	Zusammenfassung.....	176
6.	Literatur	178
7.	Anhang	187
7.1	Abkürzungsverzeichnis	187

7.2 Sequenzen 188

Abb. 1.1 Der PSII-Superkomplex.....	2
Abb. 1.2 Struktur des LHCII.	3
Abb. 1.3 Modell eines LHCII-Trimers in einer Detergenz-Mizelle.	5
Abb. 1.4 Funktionsprinzip einer Grätzel-Zelle.	6
Abb. 1.5 DSSC mit LHCII als Sensibilisator.	7
Abb. 1.6 Überlappung zwischen Donor-Fluoreszenz und Akzeptor-Emission.	9
Abb. 1.7 <i>Core-Shell-Quantum Dots</i>	10
Abb. 1.8 Struktur eines Terrylen-Diimids.....	12
Abb. 2.1 Schematische Darstellung des pDS12-RBSII-Expressionsvektor.	18
Abb. 2.2 Struktur der verwendeten Farbstoffe TDI _{Gs} , Bodipy ₅₇₇ -Mal und Rho ₅₆₀ -Mal.	21
Abb. 2.3 Methylviologen (1,1-Dimethyl-4,4-Bipyridinium).....	22
Abb. 3.1 Abnahme der Fluoreszenz verdünnter Typ-I QDs in Abhängigkeit von der Zeit.	53
Abb. 3.2 Einfluss von Reduktionsmitteln auf die QD-Fluoreszenz.	55
Abb. 3.3 Abhängigkeit der Typ-I QD-Fluoreszenz von der TCaEP-Konzentration.....	55
Abb. 3.4 Fluoreszenzverhalten von TCaEP-behandelten Typ-I QDs in Abhängigkeit der NaP-Pufferkonzentration.	56
Abb. 3.5 Einfluss von Natrium-Borat-Puffer auf die Fluoreszenz der Typ-I-QDs.....	57
Abb. 3.6 Absorptionsspektrum von Natriumborat-Puffer nach Zugabe von TCaEP.....	57
Abb. 3.7 Einfluss von Tris/HCl-Puffer auf die Typ-I QD-Fluoreszenz.	58
Abb. 3.8 Vergleich der QD-Fluoreszenz in Puffer und nach Zugabe von frischem TCaEP, altem TCaEP oder EDTA.	59
Abb. 3.9 Einfluss der Zusammensetzung einer wässrigen Umgebung auf die Fluoreszenz von Typ-II QDs mit DHLA-Liganden.....	60
Abb. 3.10 Einfluss der Zusammensetzung einer wässrigen Umgebung auf die Fluoreszenz von Typ-II QDs mit MPA-Liganden.	61
Abb. 3.11 Herstellung von LHCII-Komplexen exemplarisch gezeigt am Beispiel von ΔN11h.	62
Abb. 3.12 Charakterisierung von LHCII-Komplexen exemplarisch gezeigt am Beispiel von ΔN11h.	63
Abb. 3.13 Wiederaufbereitung von aggregierten QDs.	64
Abb. 3.14 Energietransferbetrachtungen zwischen Typ-I QDs (CdSe/6xZnS/DHLA) und LHCII-Trimeren (C3.2h).	65
Abb. 3.15 Betrachtungen des Fluoreszenzverhaltens von Donor und Akzeptor bei verschiedenen LHCII/QD-Verhältnissen.....	66
Abb. 3.16 Anregungsspektren von Hybridkomplexen aus Typ-I QDs und LHCII.	67
Abb. 3.17 Emissionsspektren von Typ-I QDs und LHCII-Trimeren (C3.2h) nach Anregung bei 560 nm.	68

Abb. 3.18 Fluoreszenzabklingzeiten der LHCII-QD-Hybridkomplexe und der Einzelkomponenten LHCII und QD.	68
Abb. 3.19 Emissionsspektren von Typ-I QDs und LHCII (C3.2h) in Tris/HCl-Puffer.	70
Abb. 3.20 Betrachtung der Typ-I QD-Fluoreszenz in Hybridkomplexen mit verschiedenen LHCII-Varianten.	71
Abb. 3.21 Energietransferbetrachtungen zwischen Typ-I QDs und LHCII-Trimeren ohne QD-Bindesequenzen ($\Delta N11$).	72
Abb. 3.22 Löschung der LHCII-Fluoreszenz in Abhängigkeit vom QD-Liganden.	101
Abb. 3.23 Untersuchung des Energietransfers zwischen LHCII-Cysteinmutanten und DHLA-QDs.	102
Abb. 3.24 Einfluss einer Markierung der Cysteine an Position 3 und 160 im LHCII auf den Energietransfer zwischen LHCII und QDs.	103
Abb. 3.25 Maximale Fluoreszenzlöschung verschiedener LHCII-Varianten in Hybridkomplexen mit Typ-II QDs.	117
Abb. 3.26 Farbstoffbedingte QD-Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit der Markierungsposition.	119
Abb. 3.27 Einfluss von TCaEP auf Alexa Farbstoffe.	119
Abb. 3.28 Energietransfer in LHCII-Hybridkomplexen ohne TCaEP.	120
Abb. 3.29 Absorptionsspektrum von reduziertem Methylviologen.	121
Abb. 3.30 Nachweis von MV^+ in einer QD-haltigen Lösung.	122
Abb. 3.31 Vergleich der Reduktion von MV durch Reduktionsmittel bzw. QDs.	122
Abb. 3.32 Nachweis der Ladungstrennung in QDs mit Hilfe von Methylviologen nach Entfernung des Sauerstoffs durch Entgasen der Lösungen.	123
Abb. 3.33 Untersuchung einer LHCII sensibilisierten Ladungstrennung in QDs mit Hilfe von MV nach Entfernung des Sauerstoffs durch einen Enzym-Mix aus Glucose-Oxidase und Katalase.	126
Abb. 3.34 Bildung von MV^+ nach Entfernung des Sauerstoffs durch einen Enzym-Mix aus Glucose-Oxidase und Katalase.	127
Abb. 3.35 Bildung von MV^+ nach Entfernung des Sauerstoffs durch einen Enzym-Mix aus Glucose-Oxidase und Katalase in Ansätzen ohne TCaEP.	128
Abb. 3.36 Untersuchung der Reduktion von MV durch Glucose-Oxidase und Katalase.	128
Abb. 3.37 Benetzung von TiO_2 -Platten mit LHCII-Trimeren.	129
Abb. 3.38 Waschüberstand einer TiO_2 -Platte in Eigenproduktion (AG Müllen, MPI für Polymerforschung, Mainz).	130
Abb. 3.39 Mit LHCII benetzte TiO_2 -Platten nach Veränderung des Sinterprozesses während Platten-Herstellung.	131
Abb. 3.40 Mit LHCII benetzte TiO_2 -Platten aus kommerzieller Herstellung.	131

Abb. 3.41 Mit LHCII benetzte TiO ₂ -Platten der Firma Solaronix.....	131
Abb. 3.42 Möglicher Energietransfer von LHCII-Trimeren auf Farbstoff TDI _{Gs}	132
Abb. 3.43 Mit LHCII und TDI _{Gs} benetzte TiO ₂ -Platten der Firma Solaronix.	133
Abb. 3.44 LHCII-Fluoreszenz auf der Unterseite von mit Farbstoff belegten TiO ₂ -Platten.	133
Abb. 3.45 Wirkungsspektrum von mit LHCII und TDI _{Gs} belegten TiO ₂ -Platten.	134
Abb. 3.46 Mit LHCII und QDs benetzte TiO ₂ -Platten der Firma Solaronix.	135
Abb. 3.47 Wirkungsspektrum von mit QDs belegten TiO ₂ -Platten.	135
Abb. 3.48 Versuch zur Integration des LHCII in Hcp1-Ringprotein.	136
Abb. 3.49 Untersuchungen der Ansätze aus LHCII und Hcp1 bzw. BSA mittels Spektroskopie..	137
Abb. 3.50 Spektrale Überlappung der Lanthanoid-Emission mit der LHCII-Absorption bzw. LHCII-Emission.	138
Abb. 3.51 Fluoreszenzspektren von mit Lanthanoid-Maleimid markierten und unmarkierten LHCII-Trimeren.	140
Abb. 3.52 Untersuchung des Energietransfers zwischen Europium und LHCII mit und ohne einer Tb-Affinitätssequenz.	141
Abb. 4.1 Strukturformeln der Nanopartikel-Liganden Mercap-topropionsäure (MPA, A) und Dihydroliponsäure (DHLA, B).	153
Abb. 4.2 Schematische Darstellung der Bindung von LHCII und QD.	159
Abb. 4.3 Energietransfer in LHCII-Hybridkomplexen mit TCaEP.	162
Abb. 4.4 Schematische Darstellung der Positionen von Farbstoff und QD bei verschiedenen LHCII-Varianten.	164
Abb. 4.5 Farbstoff löscht QD-Emission.	165

Tabelle 2.1 Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten LHCII-Varianten.....	19
Tabelle 2.2 Charakteristika der verwendeten Farbstoffe.....	20
Tabelle 2.3 Verwendete Quantum Dots.	21
Tabelle 2.4 Verwendete Mutagenese-Primer zur Herstellung neuer LHCII-Varianten.	24
Tabelle 2.5 PCR-Programm zur Herstellung des $\Delta N11$ -h.....	25
Tabelle 2.6 PCR-Programm zur Herstellung des $\Delta N11/S34C/S160C$	27
Tabelle 2.7 Verwendete Sequenzierprimer.	29
Tabelle 2.8 Messparameter zur Aufnahme von Absorptionsspektren	44
Tabelle 2.9 Messparameter zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren.....	47
Tabelle 2.10 Messparameter zur Aufnahme von Lumineszenzspektren.	47
Tabelle 2.11 Messparameter zur Aufnahme von CD-Spektren.	48
Tabelle 3.1 Halbwertzeiten (τ) und Amplituden (A) der Fluoreszenzsignale von freiem QD und LHCII bzw. in Hybridkomplexen.	69
Tabelle 4.1 Abstandsdaten zwischen verschiedenen LHCII-Varianten und CdTe/CdSe/ZnS-QDs, ermittelt anhand des Försterradius bzw. struktureller Daten.	157
Tabelle 4.2 Aminosäuresequenz des N-Terminus verschiedener LHCII-Varianten.....	160

1. Einleitung

1.1 Umwandlung von Lichtenergie in der Photosynthese

Über die Sonneneinstrahlung treffen jeden Tag große Mengen Lichtenergie auf die Erdoberfläche. Pflanzen und einige Bakterien betreiben Photosynthese; sie können also das (Sonnen-) Licht nutzen, um chemische Energie, zunächst in Form von ATP und NADPH, zu generieren. Diese dienen dann zur Erzeugung energiereicher Biomasse, von der auch andere Lebensformen abhängig sind. Die Entstehung von molekularem Sauerstoff als ein Nebenprodukt der Photosynthese war die Voraussetzung für die Entstehung des höheren Lebens auf der Erde.

Pflanzen bedienen sich im Allgemeinen sogenannter Antennensysteme, um eine effektive Lichtsammlung zu betreiben und diese Anregungsenergie an die zentral liegenden Reaktionszentren weiterzuleiten. Dort findet eine Ladungstrennung statt und die generierten Elektronen durchlaufen anschließend eine potentialabhängige Elektronentransportkette, die mit der Synthese von ATP gekoppelt ist und zur Reduktion von NADP^+ zu NADPH führt. Dabei handelt es sich um den eigentlichen Umwandlungsprozess von Lichtenergie in chemische Energie. Diese zwischengelagerte Energie wird dann bei der Herstellung von organischen Verbindungen unter Assimilation von CO_2 verbraucht. Die Antennensysteme bei Pflanzen bestehen aus verschiedenen Lichtsammelproteinen, genauer gesagt Pigment-Protein-Komplexen, die nicht nur einen Großteil des sichtbaren Lichts absorbieren, sondern aufgrund einer optimalen Anordnung der Pigmente die Anregungsenergie auch verlustarm direkt oder über andere Lichtsammler an die Reaktionszentren weiterleiten können. Zwar absorbieren auch die Reaktionszentren selbst Licht, aber durch die besondere Architektur der Antennensysteme, wird die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Photon auf das Reaktionszentrum trifft, massiv erhöht. (Heldt, 2008; McConnell, 2010).

1.2 Light-harvesting complex II (LHCII)

1.2.1 LHCII *in vivo*

In höheren Pflanzen befinden sich die Orte der Photosynthese, die Chloroplasten, hauptsächlich im Mesophyllgewebe. Die Umwandlung der Lichtenergie in die energiereichen Verbindungen ATP und NADPH findet dabei an einem Membransystem im Inneren der Chloroplasten, den sogenannten Thylakoiden statt, während die Synthese der organischen Verbindungen in der Matrix, auch Stroma genannt, abläuft. An der Lichtumwandlung in der Thylakoidmembran sind zwei funktionelle Einheiten, das Photosystem II (PSII) und das Photosystem I (PSI), beteiligt. Beide haben ihr eigenes Reaktionszentrum und besitzen unterschiedliche Lichtsammelkomplexe. Während das PSI sein Elektronendefizit nach erfolgter

Ladungstrennung durch Elektronen vom PSII ausgeht, bezieht das PSII die Elektronen durch die Oxidation von Wasser. Bei diesem Prozess entsteht elementarer Sauerstoff. Den größten Anteil der Lichtsammelkomplexe in der Thylakoidmembran stellt der *light harvesting complex II* (LHCII), der daher auch als Hauptlichtsammelkomplex bezeichnet wird (Peter, 1991). Der LHCII kommt in der Pflanze nur als Trimer vor und ist dort überwiegend am PSII zu finden. Mehrere LHCII-Trimere ordnen sich zusammen mit dem Reaktionszentrum, weiteren chlorophyllbindenden Proteinen (CP) zu einem PSII-Superkomplex an (Abb. 1.1). Dabei fällt die Bindung der einzelnen Trimere an den Superkomplex unterschiedlich stark aus (Boekema, 1999; Ballottari, 2012).

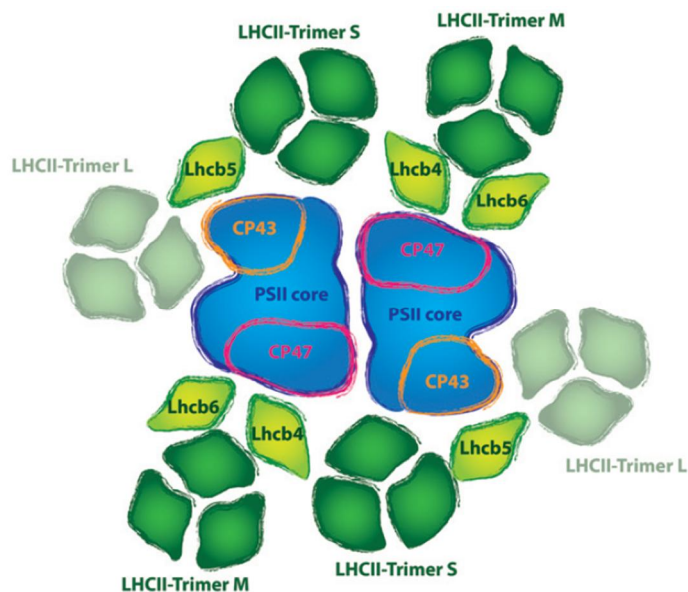


Abb. 1.1 Der PSII-Superkomplex. Abgebildet ist die vermutliche Zusammensetzung eines PSII-Superkomplexes aus zwei PSII mit jeweils einem Reaktionszentrum und den inneren Antennen (CP43, CP47), die gemeinsam den Kernkomplex (*PSII core*) bilden. Die minoren (Lhcb4-6) und die majoren Lichtsammelkomplexe (LHCII-Trimere; stark (S), moderat (M) bzw. schwach (L) gebunden) gehören zu den äußeren Antennen. Die Abbildung ist entnommen aus (Ballottari, 2012).

Neben seiner Funktion als Lichtsammelkomplex ist der LHCII in der Pflanze an weiteren Regulations- bzw. Schutzmechanismen beteiligt. Die Interaktion zwischen LHCII-Trimern in benachbarten Membranen ist mitverantwortlich für die Ausbildung der gestapelten Thylakoidstrukturen (Standfuss, 2005). Die Carotinoide innerhalb des LHCII sind in der Lage, bei Lichtstress entstehende Triplett-Chlorophylle oder Singulett-Sauerstoff in Wärme umzuwandeln und somit die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu verhindern (Frank, 1996; Standfuss, 2005). Zudem ist der LHCII in die nicht-photochemische Energielöschung (*nonphotochemical quenching*, NPQ) von Anregungsenergie involviert. Es handelt sich hier um einen Schutzmechanismus, der den Kernkomplex des PSII vor Überanregung schützt und die Bildung von reaktiver Sauerstoffspezies verhindert. Dabei spielen mehrere Komponenten eine Rolle, bei denen der LHCII hauptsächlich an den sogenannten *State Transitions* und an der energieabhängigen Löschung der Anregungsenergie (*energy dependent quenching*, *qE*) beteiligt ist. Unter *State Transition* versteht man die lichtabhängige Phosphorylierung des LHCII, die zu einer Wanderung vom PSII zum PSI und damit verbunden zu einer verstärkten Lichtsammlung am PSI führt. Dieser reversible Vorgang stellt einen

effektiven Anpassungsmechanismus an unterschiedliche Lichtbedingungen dar (Allen, 2001; Minagawa, 2011). *qE* ist die schnellste Komponente des NPQ und beschreibt die Umwandlung von überschüssiger Anregungsenergie in Wärme. Die genauen Abläufe und die Rolle des LHCII bei diesem Prozess sind umstritten (Standfuss, 2005; Barros, 2009; Ruban, 2012).

1.2.2 Struktur des LHCII

In höheren Pflanzen existieren mindestens drei verschiedene Isoformen des LHCII-Apoproteins (Lhcb1-3), die sich in der Proteinsequenz hauptsächlich an deren N-Termini unterscheiden (Jansson, 1994; Standfuss, 2004). Die Proteine von Lhcb1 und Lhcb2 machen zusammen 90 % der LHCII-Polypeptide aus und können im Gegensatz zum Lhcb3 neben Heterotrimeren auch Homotrimere bilden (Standfuss, 2004). Die Struktur des Komplexes konnte zu 96 % bis zu einer Auflösung 2.5 Å über Strukturanalysen entschlüsselt werden (Kühlbrandt, 1994; Liu, 2004; Standfuss, 2005). Vermutlich konnten die ersten neun Aminosäuren des Proteins aufgrund einer hohen Flexibilität der N-terminalen Domäne nicht aufgelöst werden (Dockter, 2012). Der native LHCII setzt sich aus drei Monomer-Einheiten zusammen, die parallel zueinander ausgerichtet sind und in der Membran mit dem N-Terminus in das Stroma des Chloroplasts ragen (Abb. 1.2). Ein LHCII-Monomer besteht aus einem 232 Aminosäuren langem Polypeptid sowie 8 Chlorophyll *a*, 6 Chlorophyll *b*, zwei Luteinen, einem Neoxanthin und einem Violaxanthin, die nicht kovalent gebunden werden. Außerdem enthält der Komplex auch Lipide wie das Phosphatidylglycerin (PG), das als „molekularer Klebstoff“ für die Trimerisierung der LHCII-Monomere essentiell ist (Nußberger, 1993). Die Funktion des Lipids Digalactosyldiacylglycerin (DGDG) dagegen ist nicht bekannt (Standfuss, 2005).

Die Polypeptidkette eines LHCII-Monomers faltet sich zu insgesamt fünf α -Helices, bei

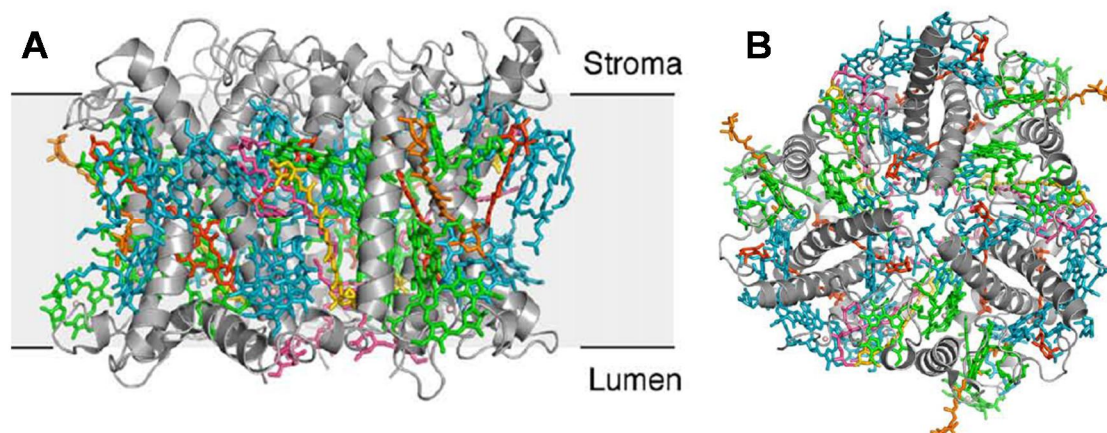


Abb. 1.2 Struktur des LHCII. Abgebildet ist die Struktur eines LHCII-Trimers in der Thylakoidmembran (A) und in stromaler Aufsicht (B). Grau: Proteinrückgrat, blau: Chl *a*, grün: Chl *b* rot: Lutein, orange: Neoxanthin, gelb: Zeaxanthin, pink: Lipide. Abbildungen verändert nach (Barros, 2009).

denen drei transmembrane Helices von zwei kurzen amphipathischen Helices auf der lumenalen Seite des LHCII unterschieden werden können (Liu, 2004; Standfuss, 2005).

Über die Faltung des LHCII *in vivo* ist nur sehr wenig bekannt. Das kerncodierte Protein wird in das Stroma des Chloroplasts über Translokons an der äußeren und inneren Membran importiert. Dort wird das hydrophobe Protein vom *chloroplast signal recognition particle* (cpSRP) gebunden, so dass ein wasserlöslicher Transitkomplex entsteht (Falk, 2010). Es ist bekannt, dass an dem Transport des LHCII-Proteins in die Thylakoidmembran und die anschließende Freilassung des Proteins noch weitere Faktoren beteiligt sind (Bals, 2010), jedoch ist nicht klar, zu welchem Zeitpunkt diese Interaktionen erfolgen bzw. wann und wo der erste Kontakt des LHCII-Protein mit den Chlorophyllen und schließlich die eigentliche Faltung des LHCII stattfinden.

1.2.3 LHCII *in vitro*

Für das Arbeiten mit dem LHCII ist eine Isolierung aus der Pflanze nicht unbedingt notwendig. 1984 gelang es, das *Lhcb1*-Gen aus *Pisum sativum* zu isolieren (Cashmore, 1984). Durch die Integration des Gens in einen Vektor, konnte das LHCII-Apoprotein in *E. coli* überexprimiert und isoliert werden (Paulsen, 1990). Unter der Zugabe von Detergenz und Pigmenten konnte dann aus dem rekombinanten Apoprotein LHCII-Monomere rekonstituiert werden (Paulsen, 1993). Für eine Trimerisierung der Monomere ist die Anwesenheit von Dipalmitoyl-Phosphatidylglycerin (PG) erforderlich (Nußberger, 1993). Je nach Verfahren können LHCII-Komplexe in Liposomen (Hobe, 1994; Boggasch, 2006) oder in Detergenz-Mizellen über eine Nickelaffinitätschromatographie trimerisiert werden (Rogl, 1998). Nach einer Saccharose-Dichte-zentrifugation zur Aufreinigung bzw. Trennung von Monomeren und Trimeren befinden sich die LHCII-Komplexe in Detergenz-Mizellen (Hobe, 1994). Es wird vermutet, dass sich die Detergenz-Moleküle als eine einlagige Schicht um den LHCII anordnen (Cardoso, 2009, Abb. 1.3) EPR-Analysen haben gezeigt, dass die Struktur des LHCII in Detergenz-Mizellen weitestgehend mit der in Röntgenkristallanalysen ermittelten Struktur von nativem LHCII übereinstimmt (Docker, 2012).

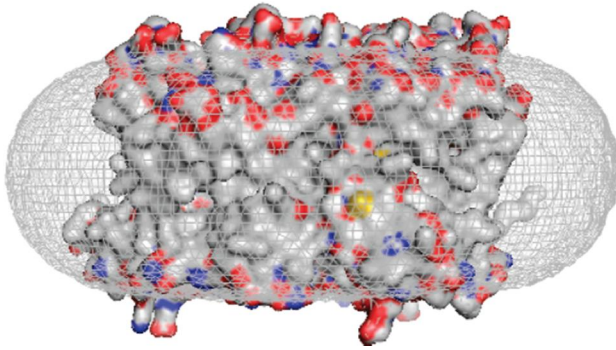


Abb. 1.3 Modell eines LHCII-Trimers in einer Detergenz-Mizelle. Abbildung wurde entnommen aus (Cardoso, 2009).

Das Arbeiten mit rekombinantem LHCII ermöglicht es, das *Lhcb1*-Gen gezielt zu modifizieren und somit verschiedene LHCII-Apoproteine herzustellen. Auf diese Weise wurden schon viele LHCII-Varianten hergestellt, die z.B. ein oder mehrere Cysteine in ihrer Aminosäure-Sequenz besitzen und darüber mit Farbstoffen oder EPR-Sonden markiert wurden (Wolf-Klein, 2002; Gundlach, 2009; Dockter, 2012). Mithilfe einer eingefügten Affinitätssequenz aus sechs Histidinen konnte der LHCII an Nanopartikel aus Halbleitermaterialien mit einer ZnS-Hülle gebunden werden (Erker, 2010).

1.3 Solarzellen

Mit einer Energieleistung von jährlich ca. 100.000 Terrawatt (TW) stellt die Sonne eine große und kostenlose Energiequelle dar (Barber, 2007). Daher wird versucht, sich diese Energie z.B. mit Hilfe von Solarzellen zunutze zu machen. In klassischen Solarzellen, wie man sie auch auf vielen Hausdächern beobachten kann, wird der Halbleiter Silicium verwendet. Damit solche Solarzellen eine hohe Effizienz erzielen, muss das Silicium hochrein sein, jedoch ist der Reinigungsprozess sehr aufwendig und teuer. Die Effizienz solcher Zellen liegt bei ca. 25 % (Green, 2012). Limitiert werden diese Silicium-Zellen vor allem durch Ladungsrekombination innerhalb des Halbleiters.

Besonders aufgrund der hohen Kosten von Silicium-Solarzellen wird schon seit Jahren an Alternativen geforscht. Die Effektivität, mit der Pflanzen Lichtenergie in chemische Energie umsetzen, hat dazu verleitet, das Prinzip der Photosynthese, nämlich eine Trennung von Photorezeptor und Ladungsträger, nachzuahmen und in technischen Applikationen anzuwenden. Die sogenannte Grätzel-Zelle oder auch *dye-sensitized solar cell* (DSSC) ist eine spezielle elektrochemische Solarzelle, die aus vergleichsweise günstigen Materialien hergestellt werden kann (Grätzel, 2007; Goncalves, 2008).

1.3.1 Dye-Sensitized Solar Cells (DSSCs)

In den von Grätzel entwickelten DSSCs kommt ein Sensibilisator-Farbstoff zum Einsatz, der in ein Halbleitermaterial wie TiO_2 eingebettet ist (Abb. 1.4 A). Durch Bestrahlung mit Licht wird der Farbstoff in einen angeregten Zustand überführt, aus dem er ein Elektron in das Leitungsband des TiO_2 übertragen kann (Abb. 1.4 B). Das Elektron wird über das Halbleitermaterial in eine leitfähige Glasplatte mit einer Indium-Zinnoxidschicht geleitet und die Elektronenlücke am Farbstoff wird durch eine Elektrolyt-Lösung wie z.B. I^-/I_3^- wieder aufgefüllt. Bei einem geschlossenen Stromkreis kann dann der Elektrolyt wiederum durch ein Elektron an der Kathode regeneriert werden.

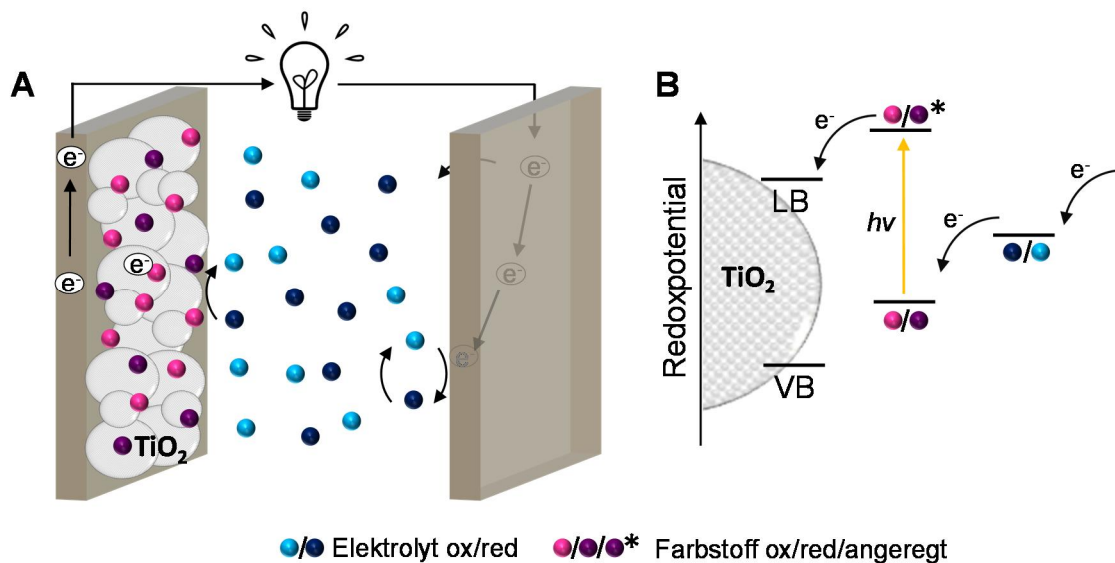


Abb. 1.4 Funktionsprinzip einer Grätzel-Zelle. A: Schematische Darstellung einer Grätzel-Zelle nach (O'Regan, 1991). Braun: leitfähige Glasplatte mit Indium-Zinnoxid-Beschichtung, blau: Elektrolyt, violett: Farbstoff. B: Übersicht der relativen Redoxpotentiale der beteiligten Komponenten. Ox = oxidiert, red = reduziert, LB = Leitungsband, VB = Valenzband.

In DSSCs wird häufig die Anatas-Form des kristallinen TiO_2 verwendet. Zwar ist hier die Potentialdifferenz zwischen Valenz- und Leitungsband größer als bei Silicium, jedoch ermöglicht die Trennung von Sensibilisator und Halbleiter einen Verzicht auf die Verwendung des teuren hochreinen Siliciums (Grätzel, 2001). Außerdem werden durch eine schnelle Ladungsinjektion des Farbstoffs Rekombinationsereignisse, wie sie beim Silicium auftreten, verringert. Dennoch liegt die Effizienz von DSSCs bei max. 12 % (unter Laborbedingungen) und somit unter der von herkömmlichen Silicium-Solarzellen (Peter, 2011). Dies liegt in erster Linie an den flüssigen Redoxsystemen, deren Haltbarkeit z.B. aufgrund von Verdunstung begrenzt ist. Auch die Geschwindigkeit, mit der die Elektrolyte den Farbstoff regenerieren, ist von besonderer Bedeutung für die Effizienz von DSSCs, daher wird intensiv an verschiedenen Redoxsystemen geforscht (Wang, 2012). Außerdem wird immer wieder versucht, alternative Sensibilisator-Farbstoffe zu entwickeln, die über eine besonders hohe Stabilität bei optimalen

spektroskopische Eigenschaften verfügen und dabei möglichst wenige Elektronen auf den Elektrolyten rücktransferieren. In diesem Zusammenhang werden auch Halbleiternanokristalle, sogenannte *Quantum Dots*, als mögliche Sensibilisator-Farbstoffe diskutiert, auch wenn eine Effizienz-Steigerung von DSSCs durch alternative Sensibilisatoren fraglich ist (Peter, 2011). Der Einsatz von mesoporösen TiO_2 als Halbleiter dient der Oberflächenvergrößerung, um möglichst viele Farbstoffmoleküle adsorbieren zu können. Dadurch wird aber die Diffusion der Elektronen wie auch der Elektrolyte, die die Elektronenlücke der Farbstoffe regenerieren, eingeschränkt und führt somit zu einer Limitierung der Effizienz von DSSCs (Roy, 2010; Kim, 2011).

1.3.2 Biologische Komponenten in Solarzellen

Da das Prinzip einer schnellen Ladungstrennung und somit eine geringe Ladungsrekombination sowie eine besonders hohe Dichte an Farbstoffmolekülen kaum so gut realisiert sind wie in der Photosynthese, werden immer wieder ganze Bestandteile des Photosyntheseapparats in DSSCs integriert und untersucht. Ganz abgesehen davon stellen alle pflanzlichen Bestandteile einen nachwachsenden und somit günstigen Rohstoff dar. Hinzu kommt die Fähigkeit photosynthetischer Organismen, ihre denaturierten Strukturen selbst zu regenerieren. Eine Übertragung solcher selbstreparierender Eigenschaften auf technische Applikationen ist Bestandteil der aktuellen Forschung und könnte zu einer ganz neuen Qualität von Solarzellen führen (Ham, 2010).

Ein Beispiel für die Verwendung von Bestandteilen des Photosyntheseapparats in photovoltaische Applikationen ist die Integration von selbstassemblierendem PSI des Cyanobakteriums *Thermosynechococcus elongatus* in eine mit Halbleitern (TiO_2 bzw. ZnO) besetzte Anordnung. Das native PSI wurde durch Peptid-Tenside stabilisiert und fungiert gleichzeitig als Lichtsammler und Elektroneninjektor. Zwar wird hier unter Einsatz von

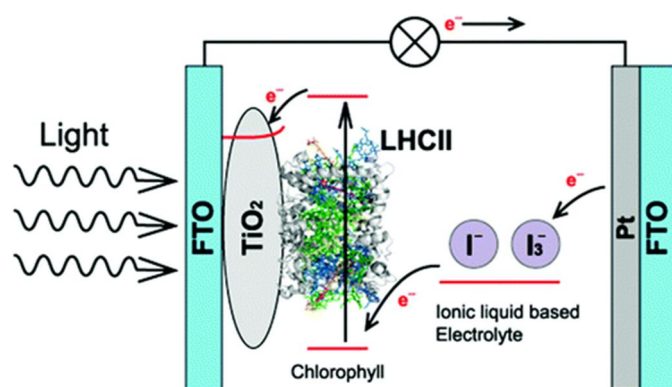


Abb. 1.5 DSSC mit LHCII als Sensibilisator. Nativer LHCII aus Spinat als Lichtsammler und Elektroneninjektor in einer DSSC. Abbildung entnommen aus (Nagata, 2012).

günstigen Materialien nur ein geringer Wirkungsgrad erreicht, jedoch betonen die Autoren, dass die Optimierung des Systems nicht ausgereizt wurde (Mershin, 2012). Auch nativer LHCII wurde auf eine Halbleiteroberfläche aus TiO_2 adsorbiert und anschließend gezeigt, dass der Lichtsammler nicht nur Photonen effektiv absorbieren kann, sondern selbst auch in der Lage ist,

Elektronen über einen Redoxmediator an den Halbleiter abzugeben (Abb. 1.5). Auch hier wurde nur eine geringe Effizienz der DSSC erzielt (Nagata, 2012).

In seiner nativen Umgebung leitet der LHCII seine Energie an das Reaktionszentrum weiter, wo letztlich die Ladungstrennung stattfindet. Der Lichtsammler ist darauf spezialisiert, seine Anregungsenergie über einen Energietransfer verlustarm an benachbarte Moleküle abzugeben. Ein entscheidender Vorteil des Pigment-Protein-Komplexes gegenüber frei vorliegenden Farbstoffen ist außerdem die hohe Pigment-Konzentration von 0,3 M (Standfuss, 2005). Chlorophylle in einer entsprechend konzentrierten Lösung würden massenhaft aggregieren (Beddard, 1976). Zudem kann der LHCII rekombinant hergestellt (siehe 1.2.3) und somit auf genetischer Ebene modifiziert werden. Dies ermöglicht eine Kopplung mit synthetischen Molekülen, die z.B. zu einer effizienten Ladungstrennung fähig sind. Eine solche Kombination könnte letztlich in einer DSSC auch mit einer Halbleiterschicht ohne eine vergrößerte Oberfläche auskommen. Dies könnte die Diffusionswege für die Elektronen und den Elektrolyten erleichtern und unter Umständen die Basis für eine alternative Grundstruktur der DSSC liefern. Eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung eines solchen Systems ist zunächst einmal die Herstellung von Hybridstrukturen, in denen nachweislich ein Energietransfer zwischen den beteiligten Komponenten stattfindet, vorzugsweise vom LHCII auf einen Akzeptor, der zu einer effektiven Ladungstrennung fähig ist.

1.4 Energietransfer

1.4.1 Grundlagen

Ein Molekül kann durch die Aufnahme von Lichtenergie in einen angeregten Zustand übergehen. Es hat nun mehrere Möglichkeiten, diese Energie wieder abzugeben. So kann es z.B. die Energie in Form von Schwingungen als Wärme oder als Fluoreszenzlicht wieder abgeben. Eine dritte Möglichkeit ist der Transfer der Energie auf ein anderes Molekül. Bei sehr kleinen Abständen zwischen Donor und Akzeptor kann ein Energietransfer über den sogenannten Dexter-Mechanismus erfolgen (Dexter, 1953). Dieser Mechanismus käme z.B. im LHCII nur für sehr dicht (< 1 nm) zusammenliegende Chlorophyll-Dimere in Frage, da sich die Elektronenorbitale überlappen müssen, damit es zu einem Elektronenaustausch kommen kann (van Amerongen, 2001). Bei etwas größeren Abständen, wie das auch bei den meisten Chlorophyllen im LHCII der Fall ist, läuft die Energieübertragung nach dem Förster-Mechanismus, auch Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) genannt, ab. Der Energietransfer findet von einem Donor im ersten angeregten Singulettzustand auf einen Akzeptor statt. Eine Voraussetzung für diesen strahlungsfreien Energietransfer ist die spektrale Überlappung der Fluoreszenz des Donors mit der Absorption des Akzeptors (Abb. 1.6). Außerdem spielt die Orientierung der Übergangsdipole von Donor und Akzeptor, sie liegen im

günstigsten Fall parallel zueinander, sowie der Abstand zwischen Donor und Akzeptor eine entscheidende Rolle. Die Energietransfereffizienz nimmt mit der 6. Potenz des Abstands ab. Der Försterradius R_0 beschreibt den Abstand zwischen Donor und Akzeptor, bei dem noch 50 % der Anregungsenergie auf den Akzeptor übertragen werden. Findet ein Energietransfer (ET) vom

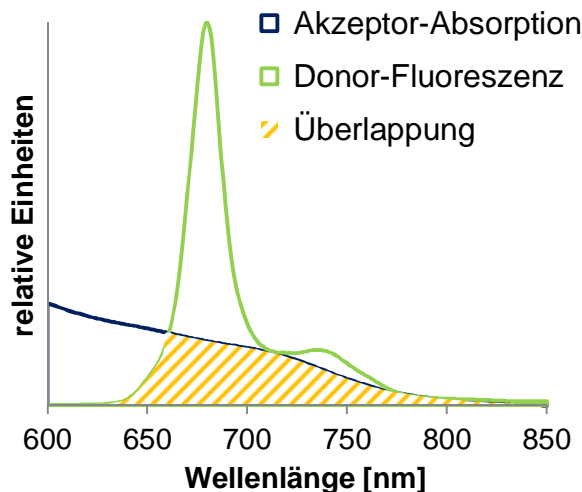


Abb. 1.6 Überlappung zwischen Donor-Fluoreszenz und Akzeptor-Emission. Beispielhafte Überlappung (gelb gestreift) der Fluoreszenz eines potentiellen Energie-Donors (grün) mit der Absorption eines potentiellen Energie-Akzeptors (blau).

Donor auf den Akzeptor statt, so fehlt Ersterem diese Energie zur Fluoreszenz. Daher kann anhand der Fluoreszenz des Donors in Ab- und in Anwesenheit des Akzeptors die Effizienz der Energieübertragung bestimmt werden (Lakowicz, 2006).

Im Zusammenhang mit der Markierung des LHCII mit Lanthanoiden (1.4.2.3) spielt der sogenannte Lumineszenz-Energietransfer (LRET) eine Rolle. Dieser basiert auf den gleichen Mechanismen wie FRET, d.h. auch hier hängt die ET-Effizienz von der spektralen Überlappung (siehe Abb. 1.6) und vom Abstand

zwischen Donor und Akzeptor ab. Man unterscheidet diese Arten von Energietransfer jedoch deshalb, weil es sich bei der Lanthanoid-Emission im physikalischen Sinne nicht um Fluoreszenz handelt (also entstehend aus dem ersten Singulett-Zustand), sondern um Emission, die sich aus elektrischen Dipolübergängen ableitet (Selvin, 2002). Diese Emission ist im Gegensatz zur Fluoreszenz (ns-Bereich) auch wesentlich langlebiger (μs - bis ms -Bereich), so dass die Möglichkeit besteht, einen LRET ohne störende Hintergrundfluoreszenz zu vermessen (Selvin, 1994).

1.4.2 Energietransfer-Partner für den LHCII

In dieser Arbeit sollte der LHCII mit Molekülen gekoppelt werden, die aufgrund einer günstigen spektralen Überlappung entweder als Energie-Donor oder -Akzeptor in Frage kommen. Im Vordergrund stehen dabei Halbleiterkristalle, sogenannte *Quantum Dots*, die wie auch manche Farbstoffe in der Lage sind, Ladungstrennung zu betreiben und daher von besonderem Interesse für die Herstellung von Hybridkomplexen mit LHCII sind.

1.4.2.1 Quantum Dots (QDs)

Halbleiternanokristalle oder auch *Quantum Dots* (QDs) sind in der Regel nanometergroße Strukturen, die aus Halbleitermaterialien wie z.B. CdSe, CdTe, CdS oder ZnS bestehen. Häufig setzen sich die Partikel aus einem Kern und einer Schale mit jeweils unterschiedlichen Materialien zusammen (*Core-Shell-QDs*, Abb. 1.7 A). Eine der hervorstechendsten Vorzüge der QDs sind deren größenabhängige spektroskopische Eigenschaften. Verantwortlich hierfür ist der sogenannte *Quantum confinement effect*, der bei Halbleiternanokristallen einer Größe von unter 20 nm zu beobachten ist. Nach der Anregung der QDs mit Licht kommt es zu einer Überführung eines Elektrons aus dem Valenzband in das Leitungsband und somit zur Ausbildung eines Elektronen-Loch-Paars. In der Regel wird dabei ein bevorzugter Abstand eingenommen, der sogenannte Bohr-Radius. Da die Größe der QDs jedoch kleiner ist als der Bohr-Radius, wird ein bestimmter Energiebetrag benötigt, um den geringeren Energieabstand zu erzwingen. Je kleiner die Partikel sind, desto größer ist der aufzuwendende Energiebetrag. Dieser wird aber auch von der Material-Zusammensetzung in Kern und Schale und von der Dicke der jeweiligen Schichten beeinflusst (Smith, 2010).

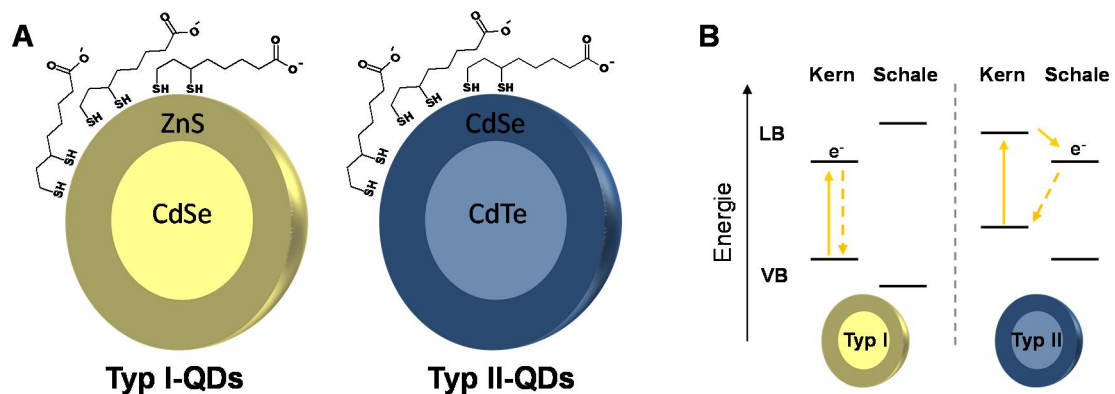


Abb. 1.7 Core-Shell-Quantum Dots. A: Schematische Darstellung von Typ I bzw. Typ-II QDs mit unterschiedlicher Zusammensetzung von Kern und Schale. Dihydroliponsäure-Liganden verleihen den QDs ihre Wasserlöslichkeit. B: Relative Energieniveaus der Valenz- (VB) und Leitungsbandern (LB) von Kerns und Schale bei Typ I- bzw. Typ II-QDs.

Im Prinzip sind alle *core-shell-QDs* aus Halbleitermaterialien zu einer Ladungstrennung fähig. Dennoch unterscheidet man hier zwischen sogenannten Typ-I und Typ II QDs. Bei den Typ-I QDs liegt das Energieniveau des Leitungsbands in der Schale höher als im Kern, so dass bei Anregung des QDs sich das Elektronen-Loch-Paar innerhalb des Kerns befindet. Bei Typ-II QDs dagegen liegt das Energieniveau des Leitungsbandes der Schale unter dem des Kerns, so dass nach Anregung von Typ-II QDs sich vermehrt Elektronen in der Schale aufhalten (Zhu, 2012). Diese lassen sich somit einfacher abgreifen als im Kern von Typ-I QDs lokalisierte Elektronen (Abb. 1.7 B). Ein Nebeneffekt dieser Separierung von Elektron und Loch ist eine Verschiebung der Absorption in Richtung längerer Wellenlängen, so dass sich das Fluoreszenz-Maximum der Typ-II QDs stark in Richtung Infrarot-Bereich verschiebt. Außerdem weisen die

Typ-II QDs eine verhältnismäßig längere Fluoreszenzlebensdauer auf, da aufgrund der reduzierten Überlappung von Elektron und Loch die Rückkehr des angeregten Elektrons in den Grundzustand verlangsamt ist (Zhang, 2009; Zhu, 2012).

Halbleiternanokristalle sind anfällig für Photooxidation, die zu einem Zerfall der QDs führen kann. Durch den Auftrag von einer oder mehrerer Schichten ZnS können die QDs passiviert und die Wahrscheinlichkeit einer Oxidation verringert werden. Außerdem besitzen die Elemente Zn^{2+} und S^{2-} relativ kleine Atomradien, so dass die Bindung von Liganden auf der QD-Oberfläche erleichtert wird (Smith, 2010). Dies ist notwendig, da eine Wasserlöslichkeit der hydrophoben Partikel erst durch Liganden vermittelt werden muss, bevor sie auch in wässrigen Lösungen eingesetzt werden können. Eine gängige Methode ist der Einsatz von Molekülen wie Mercaptopropionsäure (MPA) oder Dihydroliponsäure (DHLA), die auf der einen Seite über Sulfhydrylgruppen z.B. an ZnS-Oberflächen von QDs binden können und auf der anderen Seite über polare Gruppen verfügen, die dann zur Wasserlöslichkeit der Nanopartikel führen (Chan, 1998; Algar, 2007; Zhang, 2009).

Interaktionen zwischen *Quantum Dots* und Proteinen können über verschiedene Wege erreicht werden. Mit Hilfe von Affinitätssequenzen wie z.B. eines Hexahistidylrestes können Proteine direkt an die Oberfläche von ZnS-QDs binden (Medintz, 2003; Sapsford, 2007; Dennis, 2008; Zhang, 2011). Aber auch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem Liganden auf der Nanopartikel-Oberfläche werden für die Herstellung solcher Hybridstrukturen genutzt (Mattoussi, 2000; Erker, 2010).

1.4.2.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Die Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen ist weit verbreitet in der Proteinbiochemie. Es handelt sich bei den Fluoreszenzfarbstoffen in der Regel um Moleküle mit einem konjugierten π -Elektronensystem, die daher leicht im sichtbaren Bereich angeregt werden können und mit hoher Quantenausbeute emittieren. Natürliche Vertreter solcher Moleküle sind z.B. die pflanzlichen Chlorophylle. Synthetische Farbstoffe können vorzugsweise auch mit verschiedenen Ankergruppen versehen werden, über die sie dann an Proteine oder andere Moleküle gebunden werden können. Ein prominentes Beispiel ist die Maleimidgruppe, die mit SH-Gruppen von Cysteinen eine kovalente Bindung eingehen kann. Auch der LHCII wurde auf diese Weise schon für verschiedene Zwecke mit Farbstoffen markiert (Wolf-Klein, 2002; Gundlach, 2009; Lauterbach, 2010).

Eine besondere Gruppe der Farbstoffe bildet die Klasse der Rylenefarbstoffe, zu denen auch die Terrylen-Diimide zählen (Abb. 1.8). Rylenefarbstoffe besitzen als Grundelement eine oder mehrere Naphthaleneinheiten, wodurch ihre optischen Eigenschaften bestimmt werden. Sie verfügen über eine besonders hohe chemische und photochemische Stabilität, haben hohe Fluoreszenzquantenausbeuten und können wasserlöslich gemacht werden (Herrmann, 2006).

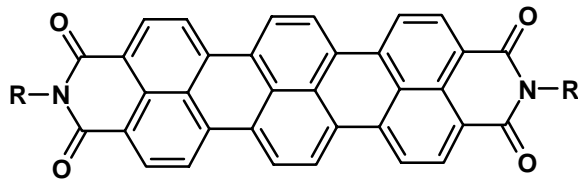


Abb. 1.8 Struktur eines Terrylen-Diimids.

Eine Besonderheit einiger Rylenfarbstoffe ist auch, dass sie Ladungstrennung betreiben können und somit in Solarzellen zum Einsatz kommen (Zhan, 2011). In vorangehenden Doktorarbeiten wurden bereits verschiedene Kombinationen aus

Rylenfarbstoffen und LHCII untersucht (Lion, 2005; Gundlach, 2010). In der vorliegenden Arbeit kam ein Terrylen-Diimid-Farbstoff zum Einsatz, der mit einem Glutarsäurerest versehen war, um mit kristallinen TiO_2 -Oberflächen interagieren zu können (siehe auch 2.2.6). Dieser Farbstoff wurde von Glauco Battagliarin (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Klaus Müllen am Max-Planck-Institut für Polymerforschung (MPI-P) für Polymerforschung in Mainz) hergestellt.

1.4.2.3 Lanthanoide

Lanthanoide sind chemische Elemente und gehören zu der Gruppe der Metalle. Europium oder Terbium sind nur zwei Vertreter dieser Gruppe, die sich durch eine außergewöhnlich lange Lumineszenzlebensdauer auszeichnen. Während die Emission von organischen Farbstoffen in der Regel wenige Nanosekunden nach Anregung wieder erloschen ist (Resch-Genger, 2008), liegt die Fluoreszenzlebensdauer von Europium bei $600 \mu\text{s}$ und von Terbium sogar bei $1,5 \text{ ms}$ (Selvin, 2002). Um ein Zielprotein spezifisch mit Terbium zu markieren, wurde es mit einem EF-Hand-Motiv eines Calciumbindepoteins versehen. Dabei machte man sich zunutze, dass Terbium einen ähnlichen Ionenradius wie Calcium hat und daher ebenfalls an das EF-Hand-Motiv binden konnte (Vazquez-Ibar, 2002). Über eine gezielte Veränderung einzelner Aminosäuren dieses Motivs wurden sogenannte *Lanthanide binding tags* (LBTs) mit einer hohen Affinität zu Terbium entwickelt (Martin, 2005).

Die Integration eines LBT in das Apoprotein ermöglicht es, den LHCII direkt mit Terbium (oder Europium) zu markieren. Dies hätte gleich mehrere Vorteile gegenüber der Markierung mit herkömmlichen Farbstoffen. Zum einen könnte aufgrund der langen Fluoreszenzlebensdauer der Lanthanoide ein LRET ohne störende Hintergrundfluoreszenz durch andere Fluorophore untersucht werden. Die LBTs enthalten in ihrer Peptidsequenz ein Tryptophan, das gezielt bei 280 nm angeregt werden kann und seine Anregungsenergie über den Dexter-Mechanismus direkt an das gebundene Terbium (bzw. Europium) weitergeben kann. Da die Lanthanoide aufgrund der sehr niedrigen Extinktionskoeffizienten kaum über eine Autolumineszenz verfügen, fluoreszieren nach der Anregung nur jene Moleküle, die auch an das Protein gebunden sind (Selvin, 2002). Zum anderen eignen sich Lanthanoide auch zur spezifischen Markierung des LHCII *in vivo*, da sie die pflanzlichen Membranen passieren können und es sich bei den LBTs um Peptidsequenzen handelt, die transgen in Pflanzen eingeschleust werden können.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Erstellung dieser Arbeit erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Basché am Institut für Physikalische Chemie der Universität Mainz und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus Müllen am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz. Das übergreifende Ziel ist es, Hybridkomplexe aus rekombinantem LHCII und synthetischen Komponenten wie Farbstoffen oder QDs herzustellen, die sich für eine Integration in photovoltaische Applikationen eignen. Da hier synthetische und biologische Komponenten kombiniert werden sollen, ist ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit, eine geeignete Pufferzusammensetzung zu finden, bei der alle beteiligten Stoffe in der Lösung verbleiben und eine spektroskopische Untersuchung der Proben möglich ist. Der LHCII soll mit verschiedenen Peptidsequenzen zur Bindung an die QDs versehen, die Affinitäten untersucht und mit bereits bekannten Affinitätssequenzen verglichen werden. Da es bislang noch nicht gelungen ist, einen Energietransfer zwischen dem LHCII und den QDs zweifelsfrei nachzuweisen, liegt ein Schwerpunkt in der Untersuchung eines FRET von den QDs auf den LHCII und umgekehrt. Von besonderem Interesse sind dabei die Typ-II QDs, die sich aufgrund ihrer spektroskopischen Eigenschaften und der Ausbildung einer Ladungstrennung zwischen Kern und Schale besonders gut als synthetisches Reaktionszentrum eignen könnten. Ähnliches gilt für bestimmte Rylene-Farbstoffe, die ebenfalls als Energieakzeptoren für den LHCII getestet werden sollen. Besonders erstrebenswert ist in diesem Zusammenhang der Nachweis einer LHCII-sensibilisierten Ladungstrennung in den synthetischen Komponenten. Auch die Optimierung der Lichtsammlung durch eine Bestückung des LHCII mit geeigneten Energie-Donoren, und damit die Entwicklung von Triaden aus LHCII, Farbstoffen und QDs, soll vorangetrieben werden. Die verschiedenen Hybridstrukturen sollen in DSSCs oder in Vorläuferstrukturen integriert und auf ihre Funktionalität getestet werden.

Über die Assemblierung des LHCII in der Pflanze ist nur sehr wenig bekannt. Die Etablierung einer Markierungsmethode am rekombinanten Protein, die sich auch eignet, um den LHCII *in vivo* zu kennzeichnen, wäre daher ein hilfreicher Schritt zu Klärung einiger offener Fragen. Als Marker sollen hier Lanthanoide eingesetzt werden, die eine besonders lange Fluoreszenzlebensdauer haben und sich daher besonders gut von anderen kurzweiliger emittierenden Molekülen wie z.B. den Chlorophyllen unterscheiden lassen. Zunächst soll rekombinanter LHCII über Maleimid-Strukturen, die Europium bzw. Terbium komplexieren, markiert werden. Es handelt sich dabei um eine bewährte Markierungsmethode, die es ermöglicht, einen Energietransfer zwischen den Lanthanoiden und dem LHCII zu untersuchen. Anschließend soll getestet werden, ob der LHCII über eine LBT-Sequenz auch direkt mit Lanthanoiden markiert werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

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

<i>Entgaser</i>	GASTORR 154
<i>Gradientenmischer</i>	LG-1580-04 Quaternay 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

- 1) Varioklav Typ 500E Dampfsterilisator, H+P Labortechnik GmbH, München
- 2) Systex DX-150, Systec GmbH Labor- & Systemtechnik, Wettenberg
- 3) Autoklaviertopf, Omni perfect, Blitz-Elektro-Erzeugnisse Manufaktur Handels-GmbH, Rosbach

Brutschrank

Modell B50, Memmert GmbH, Schwabach

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 Power Shot A710 IS, Canon Deutschland GmbH, Krefeld

Drehrad

Intelli-Mixer, NeoLab, Heidelberg

Eismaschine

Ziegra Eismaschine, Ziegra GmbH, Isernhagen

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

French Press:

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

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>	Electrophoresis 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

Magnetrührer

Ikamag RCT, IKA-Labortechnik, Staufen

Mikrotiter-Plattenleser, *InfiniteR M1000 multimode microplate reader*

Software: Tecan i-control, 1.6.19.2

UV-Mikrotiterplatten: UV-Star, 96-Well Flat Bottom, Greiner Bio-One

Mixer:

Heavy Duty Blender CB62T, Waring Commercial, New Hartford, USA

PCR-Gerät:

Primus 25 Legal PCR System, Modell 5524, MWG-Biotech, Ewersberg

pH-Meter:

Inolab pH Level2, WTW GmbH, Weilheim

Photometer:

1) Jasco V-550 UV/Vis Spectrophotometer, Jasco Labor- u. Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt

Software: Jasco Spectra Manager, Version 1.54.03, Jasco Labor- u. Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt

2) Eppendorf BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg

Reinstwasseranlage

Optilab-Standard, MembraPure, Lörzweiler

Rotationsverdampfer:

Rotationsverdampfer

Heidolph VV 2000, Heidolph Elektro, Kelheim

Vakuumpumpe

CVC 2000, Vacuubrand GmbH&Co, Wertheim

Kühlung

Minichiller, Huber Kältemaschinenbau, Offenburg

Schüttler:

für Bakterienkulturen

Certomat H, B.Braun Biotech International, Melsungen

für Gele

Shaker DOS-10L, neoLab Migge Laborbedarf-Vertrieb GmbH, Heidelberg

Sterilbank:

Laminar Flow, SLEE Semiconductor Technik GmbH, Mainz

Transilluminator:

System

VersaDoc Imaging System, Modell 3000, BioRad, München

Software

Quantity One Version 4.3.0, BioRad, München

Ultraschallbad:

Sonorex Super RK102H, Bandelin Electronic GmbH, Berlin

Ultraschallstab

Steuereinheit: V1A, V9906 Vibra Cell, Sonic&Materials Inc., Danbury, Connecticut, USA

UV-Lampe:

SFB 184, Bachhofer GmbH, Reutlingen

Vortexer:

MS2 Minishaker, IKA Labortechnik, Staufen

Waagen

Präzisionswaagen BP 2100 S; L 610, Sartorius Stedium Biotech, Göttingen
Analysenwaage A 200 S, Sartorius Stedium Biotech, Göttingen

Wasserkocher

HB4 Basic, IKA Labortechnik, Staufen

Wasserbad:

Thermomix MM, B. Braun Biotech International, Melsungen

Zentrifugen:

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

2.2 Material**2.2.1 Chemikalien**

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

- AAT Bioquest Inc., Synnyvale USA
- Agilent Technologies, Waldbronn
- Waghäusel-Wiesental (ehem. Stratagene)
- Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
- Avanti Polar-Lipids, Alabaster, USA
- BASF, Ludwigshafen
- Biomol, Hamburg
- BioRad, München
- Boehringer, Mannheim
- Fermentas, Sankt Leon-Rot
- Invitrogen, Karlsruhe
- Macherey-Nagel, Düren
- Merck KGaA, Darmstadt
- Molecular Probes Inc., Eugene USA
- 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, Deisenhofen
- Thermo Scientific, Bonn
- VWR International GmbH, Frankfurt

Zusätzlich wurden die organischen Lösungsmittel Aceton und Ether vor dem Gebrauch destilliert. Um den Ether von Peroxiden zu befreien, wurde er mit KOH-Plättchen versetzt, 2 h unter Rückfluss gekocht und anschließend destilliert. Das Aceton wurde durch die Destillation vollständig von Wasser befreit.

2.2.2 Längenstandards

Um die Größe der Proteinbanden nach einer denaturierenden Gelelektrophorese (vgl. 2.5.2.2) zuordnen zu können, wurde der „SDS-7 Marker“ der Firma Sigma-Aldrich als Längenstandard verwendet.

<u>Protein</u>	<u>Molekulargewicht (kDa)</u>
Albumin (Rinderserum)	66
Ovalbumin (Hühnereiweiß)	45
GAP-DH (Kaninchenmuskel)	36
Carboanhydrase (Rindererythrocyten)	29
Trypsinogen (Rinderpankreas)	24
Trypsininhibitor (Sojabohne)	20,1
α -Lactalbumin (Kuhmilch)	14,2

2.2.3 Bakterienstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterienstämme für Mutagenese-PCR zur Herstellung von LHCII-Varianten (vgl. 2.3.5), für Plasmid-Isolation (vgl. 2.3.3) bzw. für Überexpression von LHCII-Apoprotein (vgl. 2.4.2) verwendet.

DH5 α

Verwendung: Plasmidvervielfältigung und –isolation (*High copy number* Plasmid)

Genotyp: F⁻ Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK⁻, mK⁺) *phoA supE44* λ -*thi-1 gyrA96 relA1*

Hersteller: Invitrogen, Karlsruhe

JM 101

Verwendung: Überexpression des LHCII-Apoproteins

Genotyp: *supE thi-1* Δ (*lac-proAB*) [F'*traD36 proAB lacF* Δ M15]

Hersteller: New England BioLabs, Frankfurt am Main

RosettaTM

Verwendung: Überexpression des LHCII-Apoproteins

(Rosetta-Zellen tragen ein pRARE-Plasmid, welches für in *E. coli* selten vorkommende tRNA-Codons codiert, wodurch die Expression eukaryotischer Proteine verstärkt werden kann.)

Genotyp: F *ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm pRARE (Cam^R)*

Hersteller: Novagen, Merck Bioscience, Darmstadt

XL1-Blue *Supercompetent Cells*

Verwendung: Bestandteil des *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* von Stratagene (Agilent Technologies).

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)]

Hersteller: Agilent Technologies, Deutschland GmbH, Böblingen

2.2.4 Vektoren

Die Überexpression der verschiedenen LHCII-Varianten erfolgte stets mit dem Expressionsvektor pDS12-RBSII. Das *lhcb1*2* Gen befindet sich hier innerhalb der multiplen Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS) des Vektors (Abb. 2.1). Dieser enthält einen Promotor aus dem T5-Phagen, der unter der Kontrolle des Lac-Operons steht. Mit der Zugabe von IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid), ein Lactose-Analogon, wird die Überexpression des Apoproteins induziert. Auf dem Vektor befindet sich zusätzlich das Gen für eine β-Lactamase (Amp^r), die den β-Lactam-Ring des Ampicillins spaltet und somit den transformierten Bakterienzellen eine Ampicillin-Resistenz verleiht.

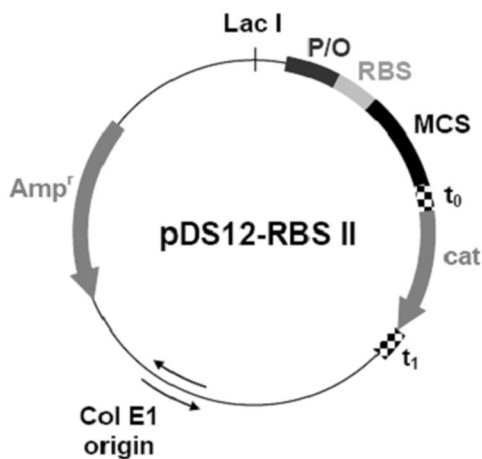


Abb. 2.1 Schematische Darstellung des pDS12-RBSII-Expressionsvektor (verändert nach Heinemann (1999)). **Col E1 origin:** Replikationsursprung, **Amp^r** β-Lactamase-Gen, **Lac I:** Lac-Repressor-Gen, **P:** T5-Promotor, **O:** *E.coli* Lac-Operator, **RBS:** Ribosomen-Binde-Stelle, **MCS:** Multiple Cloning Site mit *lhcb1*2*-Gen, **t₁** und **t₀**: Terminatoren, **cat:** Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen.

Beim pRARE-Plasmid handelt es sich um ein Plasmid, das in den Rosetta-Zellen vorhanden ist und für die in *E. coli* selten vorkommenden sechs tRNA-Codons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC und GGA codiert. Dadurch kann die Expression von Genen mit vielen Codons, die von seltenen tRNAs erkannt werden, verstärkt werden. Das Plasmid enthält ein Gen für das Enzym Chloramphenicol-Acetyltransferase, so dass die Rosetta Zellen über eine Chloramphenicolresistenz verfügen.

2.2.5 Verwendete LHCII-Varianten

Die in dieser Arbeit verwendeten LHCII-Varianten, deren mögliche (n) alternative (n) Bezeichnung (en), sowie eine Beschreibung und der Hersteller können der Tabelle 2.1 entnommen werden.

Tabelle 2.1 Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten LHCII-Varianten. Die Aminosäure-Sequenz der LHCII-Variante D7f3 entspricht der des nativen LHCII. Alle weiteren verwendeten LHCII-Varianten leiten sich von der nativen Sequenz des LHCII ab, daher beziehen sich alle Beschreibungen auf die AS-Sequenz des D7f3 und geben die Veränderung zu diesem an.

LHCII-Variante	Alternative Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
D7f3	wt (Werwie, 2012)	Wildtypischer LHCII	Dilly-Hartwig, 1998
C3.2h	wt-h (Werwie, 2012)	C-terminaler His ₆ -Tag	Kosemund, 1999
CCPGCC-C79S	tC-C79S	CCPGCC zwischen AS 8 und 9, C79S	Bohlender, 2012
CCPGCC-C79Sh	tC-C79Sh	CCPGCC zwischen AS 8 und 9, C79S, C-terminaler His ₆ -Tag	Bohlender, 2012
ΔN11	1h.19	Deletion der ersten 11 N-terminalen AS, S12R, P15A	Dilly-Hartwig, 1998
ΔN11-h	1h.19h, ΔN11h	wie ΔN11, C-terminaler His ₆ -Tag	diese Arbeit, Werwie, 2012
ΔN11/S34C/S160C	-	wie ΔN11, S34C, S160C	diese Arbeit
h-ΔN11	h1h.19	wie ΔN11, N-terminaler His ₆ -Tag	Herold, 2011
h-ΔN11-h	h1h.19h, hΔN11h	wie ΔN11, N- und C-terminaler His ₆ -Tag	Bartusel, 2011
S3Ch	-	S3C, C79S, C-terminaler His ₆ -Tag	Huschenbett, 2001
S106Ch	-	C79S, S106C, N-terminaler His ₆ -Tag	Huschenbett, 2001
S106ChC	-	C79S, S106C, C-terminaler His ₆ -Tag	Dietz, 2012
S160Ch	-	C79S, S160C, C-terminaler His ₆ -Tag	Huschenbett, 2001
V229Ch	-	C79S, V229C, N-terminaler His ₆ -Tag	Huschenbett, 2001
Tb-C79Sh	-	Terbium-Affinitätssequenz (F I D T N N D G W I E G D E L L L E E G) zwischen AS 8 und 9, C79S, C-terminaler His ₆ -Tag	Wanowska, 2012
Z8-ΔN11	Z8-1h.19	wie ΔN11, N-terminale Z8-Sequenz	Bartusel, 2011

2.2.6 Farbstoffe

In der vorliegenden Arbeit kamen überwiegend kommerziell erworbene Farbstoffe zum Einsatz. Der Rylenfarbstoff Terrylen-Diimid-Glutarsäure (TDI_{Gs}) wurde von Glauco Battagliarin aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus Müllen am MPI-P in Mainz hergestellt. Die wichtigsten Charakteristika der verwendeten Farbstoffe können der Tabelle 2.2 und die Strukturformeln (falls bekannt) Abb. 2.2 entnommen werden.

Tabelle 2.2 Charakteristika der verwendeten Farbstoffe.

Kürzel	Name	ϵ_{\max} (Ls*) [cm ⁻¹ M ⁻¹]	Abs. Max. (Ls*) [nm]	Fluor. Max (Ls*) [nm]	Fluoreszenz- quantenausbeute [%]	Hersteller
Alexa₅₅₅-Mal	Alexa Fluor® 555 C2- maleimide	155.000 (MeOH)	555 (MeOH)	572 (MeOH)	n.a.	Molecular Probes (Invitrogen)
Alexa₆₈₀-Mal	Alexa Fluor® 680 C2- maleimide	175.000 (MeOH)	684 (MeOH)	710 (MeOH)	n.a.	Molecular Probes (Invitrogen)
Alexa₇₅₀-Mal	Alexa Fluor®750 C5- maleimide	290.000 (MeOH)	753 (MeOH)	783 (MeOH)	n.a.	Molecular Probes (Invitrogen)
Bodipy₅₇₇-Mal	BODIPY® 577/618 Maleimide	60.000 (EtOH)	577 (EtOH)	618 (EtOH)	n.a.	Molecular Probes (Invitrogen)
Rho₅₆₀-Mal (Rhodamin-Red- Mal)	Rhodamine Red® C ₂ maleimide	119.000 (MeOH)	560 (MeOH)	580 (MeOH)	50 (0,1 % LM ¹)	Molecular Probes (Invitrogen)
TDI_{Gs}	Terrylen- Diimid- Glutarsäure	77.000 (THF)	612 u. 666 (THF)	682 (Toluol)	< 1	MPI-P
Eu-Mal	trFluor™Eu- Maleimide	n.a.	346 (DMSO)	617 (DMSO)	n.a.	AAT Bioquest
Tb-Mal	trFluor™Tb- Maleimide	n.a.	330 (DMSO)	488, 544 584, 621 (DMSO)	n.a.	AAT Bioquest

*Ls = Lösungsmittel, ¹Werwie, 2009

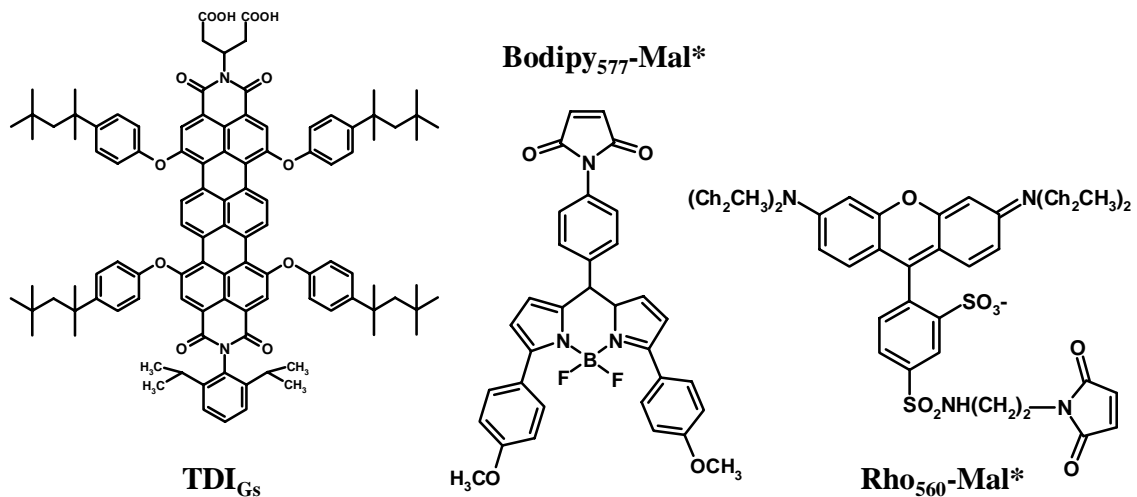


Abb. 2.2 Struktur der verwendeten Farbstoffe TDI_{Gs}, Bodipy₅₇₇-Mal und Rho₅₆₀-Mal. Die Strukturen der verwendeten Alexa-Farbstoffe sind nicht veröffentlicht. *Quelle: Invitrogen.

2.2.7 Quantum Dots

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Quantum Dots (QDs) wurden ausschließlich von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Basché am Institut für Physikalische Chemie hergestellt. Die verschiedenen QDs unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung von Kern und Schale und können in Typ-I und Typ-II QDs unterteilt werden (vgl. 1.4.2.1).

Tabelle 2.3 Verwendete Quantum Dots.

Zusammensetzung (Kernmaterial unterstrichen)	Ligand	QD-Typ	Fluoreszenz- Maximum* [nm]	Durchmesser [nm] (ohne Ligand)
<u>CdSe</u> /6xZnS	DHLA	Typ-I	~ 600	6,0 - 6,8
<u>CdTe</u> /3xCdSe/ZnS	MPA	Typ-II	~ 750	6,2
<u>CdTe</u> /3xCdSe/ZnS	DHLA	Typ-II	~ 750	6,2
<u>CdTe</u> /3xCdSe/2xZnS	DHLA	Typ-II	~ 830	7,2

*in 0,1 % LM, 0,6 M Saccharose und 50 mM NaP-Puffer pH 8,5.

2.2.8 Methylviologen

Methylviologen (1,1-Dimethyl-4,4-Bipyridinium) ist ein Redox-Indikator, der nach Reduktion einen Farbwechsel von farblos nach blau durchläuft. Aus der dikationischen quartären Ammoniumverbindung (Abb. 2.3 A) wird dabei ein monokationisches Radikal (Abb. 2.3 B), das in wässriger Lösung metastabil ist. Durch die Elektronenaufnahme verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Methylviologen aus dem UV-Bereich bei ca. 250 nm in den sichtbaren Bereich mit zwei Maxima bei 395 nm und 605 nm (Abb. 2.3 C). In Anwesenheit von Sauerstoff wird das Radikal innerhalb kürzester Zeit wieder oxidiert und somit das Methylviologen wieder farblos.

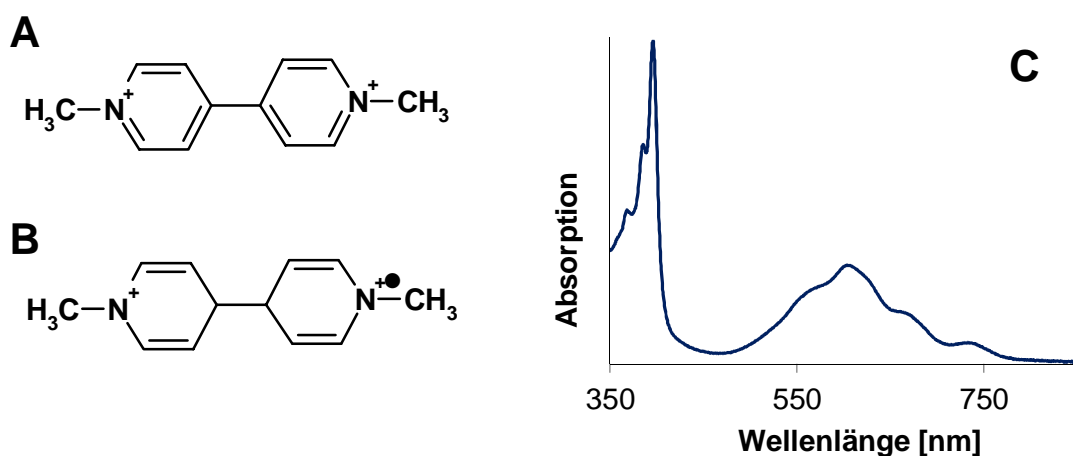


Abb. 2.3 Methylviologen (1,1-Dimethyl-4,4-Bipyridinium). A: Struktur der dikationischen Ammoniumverbindung. B: Struktur des monokationischen Radikals. C: Absorptionsspektrum des monokationischen Radikals.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Nährmedien und Platten

Für das Arbeiten mit Bakterienkulturen wurden LB-Medien bzw. LB-Agarplatten benötigt, auf denen die Organismen kultiviert werden konnten. Zur Herstellung der LB-Agarplatten wurde dem LB-Medium vor Einstellung des pH-Wertes 1,5 % (w/v) Agar hinzugegeben. Bei Bedarf wurde dem LB-Medium nach dem Autoklavieren das benötigte Antibiotikum zugefügt (Endkonzentration: 100 µg/ml Ampicillin (Amp) bzw. 34 µg/ml Chloramphenicol (Cap)). Die Zugabe des Antibiotikums erfolgte in LB-Medien kurz vor Gebrauch. Bei den LB-Agarplatten direkt nach dem Autoklavieren, sobald das Medium auf knapp 50°C heruntergekühlt war. Anschließend wurde es möglichst luftblasenfrei in sterile Plastik-Petrischalen gegossen.

LB-Medium:	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl Einstellung auf pH 7,5 mit NaOH
LB-Agarplatten:	LB-Medium 1,5 % (w/v) Agar
Amp-Stammlösung:	100 mg/ml in dH ₂ O (pH 8,0)
Cap-Stammlösung:	34 mg/ml in 100 % Ethanol

2.3.2 Vereinzeln von Bakterienkulturen, Übernachtskulturen und Dauerkulturen

Für die Vereinzeln von Bakterienkulturen wurde am Vorabend der Verwendung Bakterien aus einer Dauerkultur mit einer Impföse im Dreistrichverfahren auf einer Platte, die das entsprechende Antibiotikum enthielt, ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei Bedarf konnten die Platten anschließend mit Parafilm verschlossen für ein paar Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

Die Anzucht von Bakterien erfolgte in Form von Übernachtskulturen. Hierfür wurde am Vorabend der Verwendung die gewünschte Menge LB-Medium zu 1/1000 seines Volumens mit dem benötigten Antibiotikum versetzt (siehe 2.3.1) und eine mit einer sterilen gelben Pipettenspitze gepickte Einzelkolonie (mitsamt der Spitze) hinzugegeben. Die Einzelkolonie stammte entweder von einer LB-Platte nach einer Vereinzeln (oben) oder von einer ausplattierten Bakterienkultur nach Transformation (2.3.6.4). Das LB-Medium wurde dann über Nacht bei 37 °C und 180 UpM geschüttelt und am nächsten Morgen nach Bedarf weiterverwendet.

Um Bakterienkulturen dauerhaft aufbewahren zu können, wurden sie in Glycerin eingefroren. Hierfür werden 400 µl einer Übernachtskultur mit 600 µl sterilem 80 % Glycerin gut gemischt und bei -80 °C gelagert.

2.3.3 Plasmid-Isolation

Um Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren, wurde das *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II* (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) verwendet. Hierzu wurden ca. 12 ml einer Übernachtskultur aus Bakterien, die das gewünschte Plasmid enthalten, verwendet. Zur Plasmid-Isolation wurde nach Protokoll des Herstellers vorgegangen mit der Ausnahme, dass der letzte Zentrifugationsschritt vor der DNA-Elution für 2 min (statt 1 min) durchgeführt wurde. Die

DNA-Elution erfolgte in der Regel mit 50 µl handwarmen ddH₂O. Die Aufbewahrung der DNA erfolgte bei -20 °C.

2.3.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-haltigen Proben (doppelsträngige DNA) erfolgte photometrisch mit Hilfe des BioPhotometers (Eppendorf AG, Hamburg). In der Regel wurde hierfür 4 µl der DNA-Probe mit 66 µl ddH₂O aufgefüllt. Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgte automatisch durch das BioPhotometer über folgende Formel:

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

Dabei absorbieren die delokalisierten π -Elektronensysteme der Basen bei 260 nm, während bei 320 nm keine Absorption zu verzeichnen sein sollte. Aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm zu 280 nm erhält man Informationen über die Verunreinigung mit Proteinen, wobei bei einem Wert von 1,8 von einer proteinfreien Probe ausgegangen werden kann. Liegt der Wert darunter liegt eine Proteinkontamination vor. Eine Kontamination mit Kohlenhydraten kann über das Verhältnis der Absorption bei 230 nm zu 260 nm ausgemacht werden, wobei eine reine DNA-Probe einen Wert von 2,0 haben sollte.

2.3.5 Mutagenesen

Die Mutagenese-Strategie zur Herstellung der LHCII-Varianten h Δ N11 und Δ N11/S34C/S160 wird nachfolgend beschrieben. Die Bezeichnung und die Sequenz der dafür benötigten Primer können der Tabelle 2.4 entnommen werden. Weitere in dieser Arbeit verwendete LHCII-Varianten sind in Tabelle 2.1 zu finden.

Tabelle 2.4 Verwendete Mutagenese-Primer zur Herstellung neuer LHCII-Varianten.

LHCII-Variante	Primerbezeichnung	Primersequenz	Mutagenese-Kit
Δ N11h	deltaN11-H-	5' Phosphat 5'-TCT CAT GCT TAA TTT CTC CTC TTT A-3'	<i>Site directed</i>
	A7/Z8-DeltaN11+	5' Phosphat 5'-GGA AGC CCA TGG TAC GGA CCA GAC C-3'	<i>Mutagenesis Kit</i> (Finnzymes)
Δ N11/S34C/S160	Austausch S34C		
	LHCII-S34Cfw	5' - CC GGT GAG TCT CCA TGC TAC TTG ACT GGA GAG TTC CCC - 3'	
	LHCII-S34Crv	5' - GGG GAA CTC TCC AGT	<i>QuikChange II Site-</i>

	CAA GTA GCA TGG AGA	<i>Directed</i>
	CTC ACC GG - 3'	<i>Mutagenesis Kit</i>
Austausch S160C		(Agilent
LHCII-S160Cfw	5'- CCA CTT TAC CCA GGT	Technologies)
	GGA TGC TTT GAT CCA TTG	
	GGC TTA GCT G - 3'	
LHCII-S160Crv	5'- CAG CTA AGC CCA ATG	
	GAT CAA AGC ATC CAC CTG	
	GGT AAA GTG G - 3'	

2.3.5.1 Einfügen einer His₆-Tag codierenden Sequenz Hilfe des *Site directed Mutagenesis Kit* (Finnzymes)

Für die Herstellung der LHCII-Variante Δ N11-h wurde das *Site directed Mutagenesis Kit* von Finnzymes verwendet. Der Δ N11-h sollte der LHCII-Variante C3.2h ähneln, jedoch am N-Terminus wie der Δ N11 um 11 AS verkürzt sein (Fehr, 2010). Daher wurde so vorgegangen, dass zwei Primer (Tabelle 2.4) ausgewählt wurden, die an die Basensequenz des C3.2h binden und dabei die Sequenz aussparen, die deletiert werden sollte. Da nach der Mutagenese-PCR (Tabelle 2.5), das PCR-Produkt in Bakterienzellen des Stamms XL-1 Blue (2.2.3) transformiert wurde, die 5' phospholierte Enden ligieren können, mussten die Primer ein Phosphat am 5'-Ende tragen. Für die Mutagenese-PCR wurde nach Protokoll vorgegangen mit Ausnahme der Template-Menge. Statt der empfohlenen 10 pg wurden bis zu ca. 2,5 ng Template-DNA eingesetzt. Aus diesem Grund wurde nach der Mutagenese-PCR ein Dpn1-Verdau zur Entfernung der Template-DNA eingebaut. Dpn1 ist in der Lage die aus den Bakterien stammende methylierte DNA zu verdauen, während das unmethylierte PCR-Produkt nicht verdaut wird. Dazu wurde der gesamte PCR-Ansatz (50 μ l) mit 5 μ l 10xFastDigest Buffer und 1 μ l FastDigest Dpn1 (10 U/ μ l, Fermentas) versetzt und für 5 min bei 37°C inkubiert.

Tabelle 2.5 PCR-Programm zur Herstellung des Δ N11-h.

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aktivierung	98 °C	30 sec	1x
Denaturierung	98 °C	10 sec	
Anlagerung	64 °C	1 min	36x
Elongation	72 °C	2,5 min	
End-Elongation	72 °C	5 min	1x
Lagerung	4 °C	∞	1x

Nach der Transformation in XL-1 Blue -Bakterienzellen (2.2.3) erfolgte eine Plasmid-Isolation (2.3.3) und eine Sequenzierung (2.3.7). Da trotz positiver Sequenzierung und erfolgreicher Transformation des Plasmids mit der Information für $\Delta N11$ -h in den Bakterienstamm JM 101 (2.2.3) keine Expression des Proteins beobachtet werden konnte, wurde der Vektor in Rosetta transformiert. In diesem Bakterienstamm gelang eine Überexpression des gewünschten Apoproteins.

2.3.5.2 Austausch einzelner Basen mit Hilfe des *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies)

Die LHCII-Variante $\Delta N11/S34C/S160C$ sollte in ihrer Sequenz der Variante $\Delta N11$ entsprechen, mit Ausnahme der Serine an den Positionen 34 und 160, die durch Cysteine ersetzt werden sollten. Mit Hilfe des *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* von Agilent Technologies können solche einzelnen Basenaustausche auf dem für das *Lhcb1* codierende Gen realisiert werden. Dabei wurden die Mutagenese-Primer so designt (siehe Tabelle 2.4), dass sie die gewünschte Mutation (im Idealfall ein bis zwei Basen) mittig tragen. Diese hybridisieren mit dem Ausgangsplasmid (in diesem Fall ein pDS12-RBSII-Plasmid mit der Information für die LHCII-Variante $\Delta N11$), so dass nach Ablauf der Mutagenese-PCR überwiegend lineare Plasmide entstehen, die die gewünschte Mutation tragen. Die parentale DNA wird anschließend über Dpn1-Verdau entfernt. Dpn1 ist in der Lage die aus den Bakterien stammende methylierte DNA zu verdauen, während das unmethylierte PCR-Produkt nicht verdaut wird. Anschließend erfolgt eine Transformation in superkompetente Bakterien des Stammes XL1-Blue. Diese sind auch in der Lage, den linearen Vektor zu ligieren. Um beide Codons für die Serine (34 + 160) in ein Cystein-Codons zu verwandeln, wurde zunächst eine Mutagenese-PCR zur Veränderung eines der Codons durchgeführt und nach einer Plasmid-Isolation (2.3.3) und positiver Sequenzierung (2.3.7) erfolgte die Mutagenese des zweiten Codons.

Die Zusammensetzung der PCR-Probe erfolgte nach Protokoll, wobei jeweils nur die Hälfte der vorgegebenen Mengen verwendet wurde (=25 μ l Ansätze statt 50 μ l-Ansätze). Einzig die Menge der Ausgangs-DNA (Template) wurde auf ca. 250 ng erhöht. Dadurch enthielt der Ansatz nach der Mutagenese-PCR noch eine hohe Konzentration an Template, die über einen verlängerten Dpn1-Verdau entfernt wurde. Hierzu wurde PCR-Ansatz mit 0,5 μ l Dpn1 (10 U/ μ l) versetzt und über Nacht (statt 1 h) bei 37 °C inkubiert. Die Parameter des Programms zum Ablauf der PCR können der Tabelle 2.6 entnommen werden.

Tabelle 2.6 PCR-Programm zur Herstellung des $\Delta N11/S34C/S160C$.

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aktivierung	95 °C	30 sec	1x
Denaturierung	95 °C	30 sec	
Anlagerung	57 °C	1 min	20x
Elongation	68 °C	5 min	
Lagerung	4 °C	∞	1x

2.3.6 Transformation

Unter Transformation versteht man die Übertragung von DNA in kompetente Bakterienzellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Plasmide, die das LHCII-Gen tragen, zur Vervielfältigung der DNA bzw. zur Überexpression des Apoproteins (2.4.2) in bestimmte chemisch kompetente *E. coli*-Stämme transformiert, wobei sich die Protokolle je nach Stamm unterscheiden können.

2.3.6.1 Transformation in DH5 α

Die Transformation in Bakterienzellen des Stamms DH5 α (2.2.3) erfolgte mit dem Ziel, die Plasmid-DNA zu vervielfältigen und anschließend einer Plasmid-Isolation zu unterziehen (2.3.3). Hierfür wurden 50 μ l chemisch kompetenter Zellen 15 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde je nach Kompetenz der Zellen zwischen 1 ng und 100 ng Plasmid-DNA zu den Bakterienzellen pipettiert und für 30 min auf Eis gelagert. Es wurde stets darauf geachtet, dass das Volumen der DNA-Probe 10 μ l nicht überschritt. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 1 min, dem sich die Zugabe von 400 μ l auf 42 °C vorgewärmten LB-Mediums anschloss. Die Probe wurde danach für zwei ca. Stunden bei 37 °C auf dem Drehrad inkubiert und abschließend 250 μ l der Bakteriensuspension ausplattiert (2.3.6.4).

2.3.6.2 Transformation in JM 101

Die Transformation in Bakterienzellen des Stamms JM 101 (2.2.3) erfolgte zur Überexpression von LHCII-Apoprotein (2.4.2). Das Transformationsprotokoll ist identisch mit dem zur Transformation von DH5 α -Zellen (2.3.6.1).

2.3.6.3 Transformation in Rosetta

Die Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen des Rosetta-Stamms (2.2.3) erfolgte in Fällen, in denen das LHCII-Gen besonders viele Codons für in *E. coli* seltene t-RNAs besaß.

Die Rosetta-Zellen wurden 15 min auf Eis aufgetaut. Für die Transformation der Zellen wurden in der Regel über 200 ng Plasmid-DNA (aufgrund einer niedrigen Kompetenz der Rosetta-Charge) vorsichtig hinzu pipettiert. Auch hier wurde darauf geachtet, dass das Volumen der Plasmid-DNA unter 10 μ l lag. Anschließend erfolgte ein 30 min Inkubation auf Eis, nachdem die Probe für 1 min in ein Wasserbad mit 42 °C gestellt wurde. Es folgte eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min und die Zugabe von 450 μ l auf 42 °C vorgewärmtem SOC-Medium. Nach einer 2-stündigen Inkubation auf dem Drehrad bei 37 °C wurden 300 μ l der Bakteriensuspension ausplattiert (2.3.6.4).

SOC-Medium:

- 2 % (w/v) Trypton
- 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
- 10 mM NaCl
- 2,5 mM KCl
- 10 mM MgCl₂
- 20 mM Glukose
- Mit NaOH auf pH 7,0 einstellen.

2.3.6.4 Ausplattieren von transformierten Bakterienkulturen

Nach der Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienstämme (2.3.6) wurde die Lösung auf LB-Agarplatten (2.3.1) ausplattiert, um anschließend einzelne Bakterien-Kolonien picken zu können. Hierfür wurden je nach Bakterienstamm 250-300 μ l der Bakterienkultur tropfenweise auf die LB-Platte mit dem benötigten Antibiotikum verteilt und dann mit einem ausgeglühten Drigalski-Spatel so lange auf der Platte verteilt, bis die Bakterien-Lösung vollständig eingezogen war. Die Platte wurde anschließend über Nacht auf dem Kopf im 37 °C-Schrank inkubiert. Bei Bedarf konnten die Platten mit Parafilm verschlossen für ein paar Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.

2.3.7 Sequenzierung

Um nach einer Mutagenese die Sequenz der DNA zu überprüfen, wurde sie durch die Firma StarSEQ (Mainz) sequenziert. Hierzu wurden 400-750 ng der Plasmid-DNA mit 1 μ l eines Sequenzierprimers (10 pmol/ μ l) versetzt und gegebenenfalls mit ddH₂O auf 7 μ l aufgefüllt. In dieser Arbeit verwendete Sequenzierprimer können der Tabelle 2.7 entnommen werden.

Tabelle 2.7 Verwendete Sequenzierprimer.

Primername	Primersequenz	Bindestelle auf pDS12-RBSII-Vektor.
Seq 195+	5`- ACA TTT CCC CGA AAA GTG - 3`	ca. 195 Basen <i>upstream</i> vom LHCII-Gen
Seq 105-	5'-CC ATC ATC TTG TAT TAG TGA ACC -3'	ca. 105 Basen <i>downstream</i> vom Ende des LHCII-Gen

Nach erfolgter Sequenzierung wurde die DNA-Sequenz mit einer verwandten (korrekten) DNA-Sequenz verglichen, um den Erfolg der Mutation zu überprüfen. Der Vergleich erfolgte mit dem Programm „BioEdit“ (Version 7.0.5.3).

2.4 Präparativ biochemische Methoden

2.4.1 Pigmentextraktion aus *Pisum Sativum*

Für die Rekonstitution von LHCII-Apoprotein werden native Pigmente benötigt. Diese können nach einem Standardprotokoll aus der Erbse *Pisum sativum* isoliert werden.

Zur Anzucht der Pflanzen wurden zunächst Samen (zwei Hand voll pro Schale) in Wasser unter Luftzufuhr über Nacht eingequollen und am nachfolgenden Tag in angefeuchtetem Vermiculit ausgesät. Die Wachstumsphase im Klimaraum wurde auf 14 Tage unter Langtagbedingungen (16 h Licht) bei einer Temperatur von 20 °C und ausreichender Bewässerung limitiert.

Für die Isolation der Pigmente aus *Pisum sativum* wurden die oberen Blätter unterhalb des Blattansatzes abgeschnitten und deren Frischgewicht bestimmt. Anschließend wurde das Blattmaterial mit insgesamt ca. 1 l Aufschlusspuffer pro kg Material mit dem Mixer (*Heavy Duty Blender*) zerkleinert. Alle weiteren Schritte wurden unter dunklen und kühlen Bedingungen bewerkstelligt, um die licht- und wärmeempfindlichen Chlorophylle zu schonen. Es folgte eine Filtration durch drei Lagen Baumwolltuch und eine Lage Gaze. Nach der Zentrifugation (8.000 UpM, 4°C, 3 min, Rotor: JLA 10500, Beckmann) wurde der Überstand durch kurzes Dekantieren verworfen und das Pellet (v.a. Stärke, Thylakoide und Pigmente) in 500 ml 100 % Aceton resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (8.000 UpM, 4 °C, 10 min, Rotor: JLA 10500, Beckmann) wurde das Pellet (überwiegend Stärke) verworfen.

Um die Pigmente wasser- und acetonfrei zu bekommen, mussten sie in Ether überführt werden. Dazu wurde das Pigment-Aceton-Gemisch in einen Scheidetrichter gegeben und pro 1 kg Blattmaterial ca. 200 ml frisch destillierter Ether vorsichtig über den Rand des Trichters hinzugefügt. Anschließend wurde ebenso vorsichtig ca. 100 ml dH₂O hinzugegeben. Für eine möglichst große Kontaktfläche zwischen Ether und Aceton/Wasser-Phase wurde der Trichter in horizontal gehalten und mehrfach invertiert. Um einen Überdruck durch den Ether-Dampfdruck

zu vermeiden, wurde immer wieder Gas durch Öffnen des Ventils abgelassen. Zur Erhöhung der Polarität des Wassers, wurde dem Gemisch anfangs mehrere ml 5 M NaCl-Lösung zugegeben. Durch das Salz wird verhindert, dass wasserlöslich Xanthophylle in die wässrige Phase übergehen. Da aber auch das Aceton sich dann weniger im Wasser löst, wurde bei der Wiederholung der Schritte nach und nach immer geringer konzentriertes NaCl hinzugegeben. Nach Zugabe des Salzes wurde der Scheidetrichter vorsichtig in eine horizontale Ausrichtung gebracht, um die Kontaktfläche der beiden Phasen zu vergrößern, und ganz langsam invertiert. Auf diesem Weg entzog das polare Wasser einen Großteil des Acetons aus der Etherphase und konnte nach ca. 15 minütigen Stehenlassen als untere Phase über den Ablass des Scheidetrichters entfernt werden. Diese Schritte wurden so lange wiederholt, bis kein Aceton mehr in die Etherphase übergang (Kontrolle über Strich-Markierungen auf Scheidetrichter). Die pigmenthaltige Etherphase wurde in einen Rundkolben überführt und über Nacht bei -80°C eingefroren, um mögliche Restwasseranteile zu entfernen. Während der Ether in flüssigen Zustand verblieb, fror das Wasser bei diesen Temperaturen ein und konnte am nächsten Morgen mit Hilfe eine Wasserstrahlpumpe zügig über einen tiefgekühlten Porzellantrichter mit mehreren Rundfilterpapieren abgetrennt werden. Nach diesem Schritt wurde der Ether über einen Rotationsverdampfer unter annähernd Vakuumbedingungen (~ 10 mbar Druck) entfernt, die eingengten Pigmente in ca. 20 ml wasserfreiem Aceton gelöst und der Chlorophyllgehalt bestimmt (2.6.1.2). So konnten Aliquots mit 1, 2 und 5 mg Gesamtchlorophyllgehalt hergestellt, über einen Stickstoffstrom eingetrocknet und bei -20°C aufbewahrt werden.

Aufschlusspuffer: 25 mM Tris/HCl (pH 7,0)
1 mM DTT
330 mM Sorbitol

Erbse: *Pisum Sativum* Variante „Lisa“ oder „Kleine Rheinländerin“

Vermiculit: Härte 4, Firma Klein Dämmstoffe, Zellertal

2.4.2 Überexpression und Isolation von LHCII-Apoprotein

Nach der Aufnahme von pDS12-RBSII-Plasmiden, die das Lhcb1-Gen enthalten, sind JM 101 bzw. Rosetta-Zellen in der Lage das LHCII-Apoprotein zu exprimieren. Die Expression steht unter der Kontrolle des Lac-Promotors, wobei nach Zugabe von IPTG (Isopropylthiogalaktosid) eine Inhibition des Promotors aufgehoben wird und es somit zu einer gezielten Expression des Lhcb1-Gens kommt. Das Protein wird in den Bakterien in Form von Einschlusskörperchen (*Inclusion Bodies*, IBs) im Cytosol angehäuft und muss zur Verwendung aus diesen isoliert werden.

Zur Vorbereitung für die Überexpression von LHCII-Apoprotein wurde eine 800 ml Übernachtskultur der gewünschten Bakterien hergestellt (2.3.2). Am nächsten Morgen wurden 800 µl einer 1 M IPTG-Lösung zum Medium gegeben und für weitere 4 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur abzentrifugiert (8.000 UpM, 4°C, 10 min, Rotor: JLA 10.500, Beckmann), der Überstand verworfen und das Pellet in 30 ml Lysispuffer resuspendiert. Die Zellwände der Bakterien wurden anschließend durch zwei bis drei Durchgänge in der *French Press* oder durch 5 min Behandlung mit dem Ultraschallstab (Intensität 5, 50 % Zyklus, Probe in Glasröhrchen) aufgebrochen. Danach erfolgte eine Zentrifugation des Lysats (8.000 UpM, 4°C, 8 Minuten, Rotor: JA 20, Beckmann). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 15 ml Detergentienpuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (8.000 UpM, 4°C, 8 min, Rotor: JA 20, Beckmann). Anschließend wurde das Pellet in 15 ml Tritonpuffer gelöst und über Nacht im Kühlraum auf dem Drehrad inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Suspension erneut zentrifugiert, das Pellet in 15 ml Trispuffer und nach einer letzten Zentrifugation in 2-4 ml Trispuffer resuspendiert. So konnten die IBs bei -20 °C aufbewahrt werden. Die Konzentrationsbestimmung der IBs erfolgte über Absorptionsspektroskopie (2.6.1.3), die Überprüfung der Reinheit mittels einer denaturierenden SDS-Polacrylamid-Gelelektrophorese (2.5.2.2).

Lysispuffer:	0,8 mg/ml DTT 4 µg/ml DNase I
Detergentienpuffer:	200 mM NaCl 1 % (w/v) Desoxycholsäure 1 % (w/v) Triton X-100 20 mM Tris/HCl (pH 7,5) 2 mM EDTA 10 mM β-Mercaptoethanol
Tritonpuffer:	20 mM Tris/HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA 0,5 % Triton X-100 (w/v)
Trispuffer:	50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA

2.4.3 Detergenzwechselrekonstitution des LHCII-Apoproteins

Die Faltung des LHCII-Apoproteins zu LHCII-Monomeren wurde nach dem Protokoll der Detergenzwechselrekonstitution durchgeführt (Paulsen, 1993).

250 µg des benötigten Apoproteins wurden mit der Tischzentrifuge anzentrifugiert und bei großen Volumina der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde anschließend in 300 µl 2x

Solubilisierungspuffer unter Vortexen und Ultraschall gelöst. Daraufhin wurde die Lösung in 300 μ l dH₂O verdünnt und bei 100°C für 1 min aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf RT wurden 3 μ l 1 M β -ME hinzugegeben und vermischt.

Pro 250 μ g LHCII-Apoprotein wurden 500 μ g Pigmentextrakt (2.4.1) in 60 μ l 100 % Ethanol p.A. gelöst. Die Pigmentlösung wurde unter Vortexen zur Proteinlösung hinzugegeben und der Ansatz weitere 30 sec gevortext. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden dann 75 μ l 10 % OG zugesetzt und die Lösung 15 sec gevortext. Nach weiteren 10 min Inkubation bei RT wurden 75 μ l 2 M KCl zugegeben, erneut gevortext und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe des KCl wird das SDS als Kaliumsalz ausgefällt. Nach einer Zentrifugation (15 min, 4 °C, 14000 UpM, Rotor: 1195, Hettich Mikro 22 R) zur Beseitigung des ausgefallenen SDS wurde der Überstand erneut mindestens 30 min auf Eis inkubiert und nochmals wie oben zentrifugiert. Der Überstand, der die gefalteten LHCII-Komplexe in Form von Monomeren enthielt, wurde abgehoben und stand zur weiteren Verwendung zur Verfügung.

2x Solubilisierungspuffer: 200 mM Tris/HCl (pH 9,0)
 25% (w/v) Saccharose
 4% (w/v) SDS

2.4.4 Trimerisierung von His₆-Tag-tragenden LHCII-Monomeren über Affinitätschromatographie

LHCII-Monomere, die einen His₆-Tag tragen können über eine Affinitätschromatographie an einer Nickel-Sepharose-Säule trimerisiert werden (Rogl, 1998). Dabei interagieren die Ni-Ionen mit der IDA (Iminodiessigsäure)-Sepharose und binden gleichzeitig das Protein über Interaktionen mit den Histidinen an die Säule. Nach der Waschung mit verschiedenen Puffern, die auch das zur Trimerisierung benötigte PG enthalten (siehe 1.2.2), konnten die trimerisierten LHCII-Komplexe über einen Imidazol-haltigen Puffer eluiert werden. Das Imidazol konkurriert mit den Histidinen um die freien Koordinationsstellen des Nickels und verdrängt, da im hohen Überschuss, die LHCII-Komplexe von der Säule. Diese Standardmethode wurde wie bei Gundlach (2010) beschrieben durchgeführt.

2.4.5 Trimerisierung von His₆-Tag-freien LHCII-Monomeren durch Integration in Liposomen

Die Trimerisierung von LHCII-Monomeren, die nicht über einen His₆-tag verfügten, wurde über eine Integration der Komplexe in Liposomen durchgeführt. Dabei wurden LHCII-Monomere mit in Detergenz (OG) angelösten PG-Liposomen gemischt und das Detergenz anschließend über Polystyrolkugeln, sogenannte *BioBeads*, entfernt. Während dieses

Prozesses kommt es zur Trimerisierung einiger LHCII-Monomere. Diese Standardmethode wurde wie bei Gundlach (2010) beschrieben durchgeführt.

2.4.6 Aufreinigung von LHCII-Komplexen über Ultrazentrifugation

Aufgrund der unterschiedlichen Dichte ist es möglich freies Pigment, LHCII-Monomere und LHCII-Trimere durch Ultrazentrifugation im Saccharosedichtegradienten voneinander zu trennen. Zur Herstellung eines Saccharosegradienten wird eine Saccharosegradientenlösung in Polyallomer-Röhrchen (MWG Biotech, Ebersberg) bei -20 °C eingefroren. Durch langsames und erschütterungsfreies Auftauen bei 4 °C entsteht aufgrund der unterschiedlichen Gefrierpunkte von Wasser und Saccharose ein linearer Saccharosegradient mit der höchsten Saccharose-Dichte am Boden. Die Gradienten wurden jeweils 2-3 h vor der Verwendung zum Auftauen in den Kühlraum (4 °C) gestellt.

Vor dem Auftrag des Rekonstitutionsgemischs auf die Ultrazentrifugen-Röhrchen wurde die der Probe entsprechende Menge an Saccharosegradientenlösung vorsichtig von oben entfernt. Die Zentrifugation selbst erfolgte für 16 h bei 54.000 UpM und 4 °C (Rotor: SW60 Ti, Optima XL-100K). Am nächsten Tag wurden die Gradientenröhrchen zur Dokumentation der grünen Banden fotografiert und die Monomer- bzw. Trimerbanden mit Hilfe einer Spritze abgenommen. Die LHCII-Proben wurden anschließend spektroskopisch untersucht (siehe 2.6) und konnten dunkel und kühl gelagert mehrere Wochen aufbewahrt werden.

Saccharosegradientenlösung: 0,6 M Saccharose
0,1 % LM
5 mM Tris/HCl pH 7,5*

Saccharosegradientenlösung: 0,6 M Saccharose
für Arbeiten mit QDs 0,1 % LM
50 mM NaP pH 8,5*

*Enthielten die LHCII-Varianten ein oder mehrere Cysteine in ihrer Proteinsequenz, wurde der Saccharosegradientenlösung pro Cystein 2 mM TCaEP zugefügt.

2.4.7 Aufkonzentrierung und Pufferaustausch von LHCII- oder QD-Lösungen

Um eine LHCII-Lösung aufzukonzentrieren oder einen Pufferwechsel vorzunehmen, kamen 30 kDa *Centricons* zum Einsatz (Amicon Ultra MW 30; Millipore, Cork, Irland). Diese besitzen eine Cellulosemembran, die Moleküle bis zu einer Größe von unter 30 kDa passieren lässt und größere Moleküle zurückhält. So können Saccharose und andere Pufferkomponenten aus einer Lösung entfernt werden, während z.B. Detergenz-Mizellen und darin enthaltene LHCII-Moleküle in der Lösung zurückbleiben und somit aufkonzentriert werden. Auf diese Weise konnten auch

QD-Lösungen oder LHCII-QD-Hybridkomplexe aufkonzentriert werden. Um einen Pufferwechsel durchzuführen, wurde die Lösung immer wieder mit der gewünschten Pufferlösung auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und erneut aufkonzentriert. Diese Schritte wurden mindestens viermal wiederholt.

Die *Centricons* wurden vor Gebrauch mit dH₂O gefüllt und 5 min bei 6.000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Die Probe konnte anschließend ebenso bis zum gewünschten Volumen maximal aber bis zu 50 µl, aufkonzentriert werden. Zur Reinigung wurden die *Centricons* mit Centriconwaschpuffer befüllt und über Nacht stehen gelassen. Die Lagerung der Zentrifugaleinheiten erfolgte in 20 % Ethanol.

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

2.4.8 LHCII-Farbstoff-Hybridkomplexe

2.4.8.1 Markierung von LHCII-Apoprotein mit Maleimid-funktionalisierten Fluoreszenzfarbstoffen

Maleimide können mit Cysteinen in Proteinen reagieren und kovalente Bindungen ausbilden. Auf diese Weise können also maleimidfunktionalisierte Farbstoffmoleküle an Proteine gebunden werden, die ein oder mehrere Cysteine in ihrer AS-Sequenz enthalten. Damit die Cysteine für eine Reaktion zur Verfügung stehen, müssen sie reduziert vorliegen.

Diese Markierungsmethode wurde für die Farbstoffstoffe Alexa₅₅₅-Mal, Alexa₆₈₀-Mal, Alexa₇₅₀-Mal Bodipy₅₇₇-Mal Rho₅₆₀-Mal (siehe 2.2.6) angewendet. Zur Vorbereitung der Farbstoffe wurden kleine Mengen an Farbstoff portionsweise in ca. 50 µl DMSO gelöst. Über Absorptionmessungen wurde überprüft, ob die Farbstoffkonzentration für die Markierung ausreichend hoch war, gegebenenfalls wurde die Farbstoffkonzentration weiter erhöht. Reste des in DMSO gelösten Farbstoffs wurden mit Stickstoff überschichtet und konnten so über einen längeren Zeitraum bei -20°C aufbewahrt werden.

Die Markierungen von LHCII-Apoprotein wird im Folgenden für 300 µg IBs beschrieben. Bei größeren Volumina wurde die IB-Probe zunächst anzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde anschließend unter Vortexen und Ultraschall in 150 µl 1 % LDS gelöst, bevor 60 µl 100 mM Natriumphosphat pH 7,0 zugegeben und die Probe mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 300 µl aufgefüllt wurde (inklusive des TCyEP, das erst nach dem Kochen zugegeben wurde). Das Gemisch wurde anschließend zur vollständigen Denaturierung des Proteins 1 min bei 100 °C gekocht. Nach dem Abkühlen des Ansatzes auf RT wurden zur Reduktion pro Cystein 6 µl einer 1 M TCyEP-Lösung hinzuzufügen. Die Reduktion erfolgte für 2 h auf dem Drehrad bei 37 °C. Nach der Reduktion der SH-Gruppen erfolgte die eigentliche Markierungsreaktion. Hierfür wurde zu dem Proteinansatz ein 15-fach molarer Überschuss an

Farbstoff hinzugeben und über Nacht bei 37 °C auf dem Drehrad inkubiert. Nach der Markierungsreaktion wurde das Apoprotein durch Zugabe vom 0,1-fachen des Probenvolumens an 100 mM Essigsäure und dem 2,3-fachen an 100 % Aceton ausgefällt. Der Vorgang erfolgte in der Regel über Nacht bei -20°C, mindestens aber für 3 h. Anschließend wurde das Protein abzentrifugiert (15.000 UpM, 4 °C, 10 min, Rotor: 1195-L, Hettich Mikro 22 R) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in ca. 300 µl eiskaltem 70 % Ethanol abwechselnd unter Vortexen und Ultraschallbehandlung resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert (15.000 UpM, 4 °C, 10 min). Diese Schritte wurden mindestens viermal wiederholt, bis der Überstand keine Färbung mehr zeigte. Nach einem letzten Waschschrift mit eiskaltem 100 % Ethanol wurde das Pellet für ca. 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 600 µl 1x Solubilisierungspuffer (siehe 2.4.3) resuspendiert.

Es folgte eine photometrische Bestimmung des Proteingehalts (2.6.1.3). Bis zur weiteren Verwendung konnten die markierten Apoproteine bei -20°C im Gefrierfach aufbewahrt werden.

2.4.8.2 Markierung von LHCII-Trimeren mit Lanthanoid-Maleimiden

Die Markierung des Lichtsammelproteins mit Lanthanoiden-Maleimiden erfolgte an LHCII-Trimeren. Dazu wurden Stammlösungen an trFluorTMTb- bzw. trFluorTMEu-Maleimid (Tb-Mal und Eu-Mal) angesetzt, indem je ein 100 µg Farbstoff-Aliquot in 20 ml DMSO gelöst wurde. Für die Markierungsreaktion wurden über Ultrazentrifugation aufgereinigte LHCII-Trimere (in 0,1 % LM, 0,6 M Saccharose und 5 mM Tris/HCl pH 7,5) mit einem zehnfachen Überschuss an Eu-Mal- bzw. Tb-Mal pro Cystein versetzt und für 16 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde aus den Proben zunächst die Saccharose beseitigt (2.4.7), bevor sie zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffs erneut über Ultrazentrifugation aufgereinigt wurden (2.4.6). Im Anschluss wurden die Trimerbanden abgezogen, die LHCII-Konzentration (2.6.1.1) bestimmt und die Proben für LRET-Messungen verwendet (2.6.2.3).

2.4.8.3 Markierung von LHCII-Trimeren mit Europium

Die Markierung von LHCII mit EuCl₃ erfolgte ebenfalls an aufgereinigten Trimeren (in 0,1 % LM, 0,6 M Saccharose und 5 mM Tris/HCl pH 7,5). In der Regel wurde die Markierungsreaktion an Trimeren der LHCII-Variante Tb-C79Sh durchgeführt, die über eine Tb-Affinitätssequenz verfügt (siehe 2.2.5).

Zunächst einmal wurde eine 0,1 mM EuCl₃-Stammlösung angesetzt, indem das Salz in dH₂O gelöst wurde. Für die Markierungsreaktion wurde ein fünffacher Überschuss an Eu³⁺ pro Monomer zur LHCII-Lösung gegeben und für ca. 3 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde aus den Proben zunächst die Saccharose beseitigt (2.4.7), bevor sie zur Entfernung von überschüssigem Eu³⁺ erneut über Ultrazentrifugation aufgereinigt wurden

(2.4.6). Im Anschluss wurden die Trimerbanden abgezogen, die LHCII-Konzentration bestimmt (2.6.1.1) und die Proben für LRET-Messungen verwendet (2.6.2.3).

2.4.9 LHCII-QD-Hybridkomplexe

2.4.9.1 Herstellung von LHCII-QD-Hybridkomplexen

LHCII-QD-Hybridkomplexe wurden Ultrazentrifugation und über FRET-Analysen untersucht. Die Herstellung von Trimer-Hybridkomplexen mit QDs erfolgte durch spontane Interaktion während einer 90 minütigen Inkubation im Dunkeln und auf Eis. Für die Ultrazentrifugationsversuche (2.4.9.2) wurden 50 µl Ansätze (Standard: 200 nM QDs und 200 nM LHCII-Trimere) und für die FRET-Analysen (2.6.2.1) wurden 500 µl Ansätze (Standard: 15nM LHCII-Trimere und 15nM QDs) hergestellt. Der Puffer bestand (wenn nicht anders angegeben) aus 0,6 M Saccharose, 0,1 % LM, 2 mM TCaEP und 50 mM NaP pH 8,5.

Für die Herstellung von Triaden aus LHCII, Farbstoff und QDs wurde das LHCII-Apoprotein vor der Rekonstitution markiert (2.4.8.1). Nach der Rekonstitution, Trimerisierung und Aufreinigung wurden die markierten LHCII-Trimere wie oben beschrieben mit den QDs zusammengegeben.

2.4.9.2 Ultrazentrifugationsversuche mit LHCII-QD-Hybridkomplexen

Eine Strategie zur Untersuchung von LHCII-QD-Hybridkomplexen waren Ultrazentrifugationsversuche. Dabei konnte freier LHCII von an QD gebundenem LHCII über Zentrifugation in der Airfuge (Beckmann, Rotor A-110) getrennt werden, da nur die QDs und eben an die QDs gebundene LHCII-Komplexe in der Lage sind, ein 1M-Saccharosekissen zu passieren. Freier LHCII verbleibt im Überstand. Für die Ultrazentrifugationsversuche wurden 50 µl der Hybridkomplexlösung (2.4.9.1) vorsichtig auf 130 µl Airfuge-Puffer in einem Zentrifugenröhrchen (Polyallomer Centrifuge Tube, 5x20 mm, Beckmann) pipettiert. Es erfolgte eine Zentrifugation über 20 min bei RT und 105.000 UpM. Anschließend wurden 50 µl des Pellets abgenommen, mit TCaEP versetzt (Endkonzentration 2 mM) und mit Puffer (0,6 M Saccharose, 0,1 % LM und 50 mM NaP pH 8,5) auf 500 µl aufgefüllt. Bei der Aufnahme der Pellet-Fraktion musste genau darauf geachtet werden, dass das gesamte Pellet aufgenommen wurde. Unter Umständen musste das Pellet zur vollständigen Resuspension mehrfach kurz ins Ultraschallbad getaucht werden. In Ausnahmefällen war das Pellet derart schwer löslich, dass eine Behandlung der Probe mit dem Ultraschallstab erfolgte. Hierzu wurde die Pellet-Probe für ca. 30 sec Sekunden bei einer Intensität von 2 und einem Zyklus von 20 % behandelt. Die restlichen 130 µl des Zentrifugationsansatzes (Überstand) wurden analog zur Pellet-Probe mit TCaEP versetzt und mit Puffer auf 500 µl aufgefüllt. Die Konzentrationsbestimmung des LHCII in den Fraktionen erfolgte dann über Absorption (2.6.1.1). Dabei musste berücksichtigt werden,

dass auch die in der Probe enthaltenen QDs bei 670 nm absorbieren. Aus diesem Grund wurde dem Absorptionsmaximum der Probe bei 670 nm die Absorption bei 700 nm abgezogen.

Da es bei der Aufnahme des Pellets nach der Zentrifugation auch zu einer Verschleppung von freiem LHCII aus dem Überstand kommen konnte, wurde eine sogenannte LHCII-Verschleppungsreihe ermittelt (Fehr, 2010). Hierfür wurden die LHCII-Proben analog den Hybridkomplex-Proben jedoch ohne QDs angesetzt, auf den Airfugepuffer pipettiert und zentrifugiert. Die Proben wurden ebenfalls in eine Pellet- und Überstandfraktion aufgeteilt und anschließend photometrisch ermittelt, wie viel LHCII sich im Pellet befand. Der Vorgang wurde mindestens drei Mal wiederholt und ein Mittelwert berechnet. Dieser konnte dann von den in den LHCII-QD-Hybridkomplexen ermittelten LHCII-Konzentrationen der Pellets abgezogen werden.

Airfuge-Puffer	50 mM NaP pH 8,5
	0,1 % LM
	1 M Saccharose

2.4.10 Nachweis einer Ladungstrennung in QDs mit Methylviologen

Ein Ziel dieser Arbeit war der Nachweis einer LHCII-sensibilisierten Ladungstrennung in QDs. Um diese Ladungstrennung detektieren zu können, sollte der Elektronenakzeptor Methylviologen (1,1'-Dimethyl-4,4'-Bipyridinium, MV, siehe 2.2.8) verwendet werden. Diese farblose Substanz absorbiert nach Reduktion im sichtbaren Bereich. Über die Absorptionsmaxima bei 395 nm bzw. 605 nm kann die Menge an reduziertem MV nachvollzogen werden und dadurch Rückschlüsse auf eine Ladungstrennung durch QDs oder andere Moleküle in der Lösung gezogen werden. Die Anwesenheit von Sauerstoff in der Lösung führt zu einer schnellen Rück-Oxidation des reduzierten Methylviologens, so dass es sich wieder entfärbt und über stationäre Absorptionsspektroskopie keine sichere Information über Ladungstrennung in QDs gesammelt werden kann. Aus diesem Grund musste der Sauerstoff in Lösungen entfernt werden. Dies wurde einmal über Entgasen der Lösung (2.4.10.1) und einmal über einen sauerstoffverbrauchenden Enzym-Mix (2.4.10.2) versucht.

2.4.10.1 Entgasen von wässrigen Lösungen

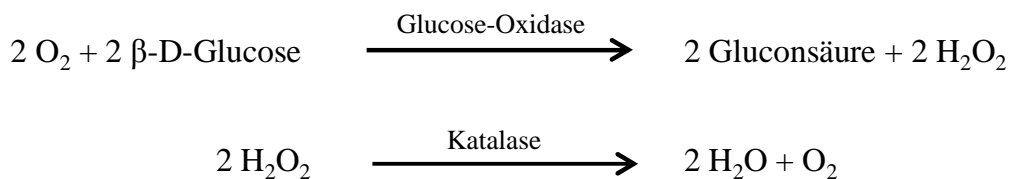
Zur Entfernung des Sauerstoffs wurden die entsprechenden (detergenzfreien) Lösungen in eine Saugflasche gegeben und über einen Dreiwegehahn mit einer Wasserstrahlpumpe und einer Stickstoffquelle verbunden. Zunächst wurde das System mit Stickstoff geflutet. Anschließend wurde die Wasserstrahlpumpe für 15 min geöffnet, so dass die Lösung durch den entstehenden Unterdruck entgast wurde. Danach wurde das System bei leichtem Wasserstrahl wieder mit

Stickstoff geflutet, um das Eindringen von Luft (und somit von Sauerstoff) zu verhindern. Die Lösung wurde nun unter Stickstofffluss in ein verschließbares Gefäß umgefüllt, erneut mit Stickstoff geflutet und luftdicht verschlossen.

Da Lösungen mit Detergenz aufgrund einer massiven Blasenbildung nicht entgast werden konnten, wurden detergenzhaltige Bestandteile in möglichst geringen Volumina zu den entgasten Proben gegeben. Eine vollständige Entfernung des Sauerstoffs in Proben mit LHCII war auf diesem Weg daher nicht möglich.

2.4.10.2 Entfernung von Sauerstoff in wässrigen Lösungen durch Glucose-Oxidase und Katalase

Eine Alternative zur Entfernung von Sauerstoff über Entgasen war das Anreichern der zu untersuchenden Proben mit einem Enzym-Mix aus Glucose-Oxidase und Katalase. In Anwesenheit des Substrats D-Glucose erfolgt eine Umsetzung von Sauerstoff nach folgender Gleichung (Englander, 1987):



In der Nettoreaktion wird daher durch die Glucose-Oxidase und die Katalase pro zwei Molekülen D-Glucose ein Molekül molarer Sauerstoff (O_2) verbraucht.

Zur Entfernung des Sauerstoffs aus einer Probe über den Enzym-Mix wurde eine Enzym-Mix-Stammlösung mit 10 mg Glucose-Oxidase (*Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich) und 1 mg Katalase (Rind, Sigma-Aldrich) in 500 ml dH_2O hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurden 1-2 μl zu einer 500 μl Probenlösung in einer Messküvette gegeben und mit einem Deckel verschlossen. Vor Durchführung der Messung wurde die Probe für 5 min bei RT und im Dunkeln stehen gelassen.

2.4.10.3 Optimierter Methylviologen-Ansatz mit Enzym-Mix

Für den Nachweis einer LHCII-sensibilisierten Ladungstrennung erfolgten einige Optimierungsschritte bis zur finalen Probenzusammensetzung, mit der die Messungen schließlich durchgeführt wurden. Die Proben (500 μl) setzten sich dabei aus mehreren Komponenten zusammen, wobei die Zugabe von QDs, LHCII oder beidem von der gewünschten Probenzusammensetzung abhing.

Optimierter Probenansatz:	5,1 mM Methylviologen
(500 μ l)	10 mM EDTA pH 8,0
	2 mM TCaEP
	0,3 % (w/v) D-Glucose
	0,5 - 0,75 nM QDs (optional)
	0,5 μ M LHCII-Trimere (=1,5 μ M Monomere, optional)

Nach dem Auffüllen der Probe mit Puffer (0,6 M Saccharose, 0,1 % LM, 50 mM NaP 8,5) auf 500 μ l wurde der Ansatz in die Messküvette umgefüllt und mit 2 μ l an Enzym-Mix versetzt (2.4.10.2). Die Küvette wurde mit einem Deckel und Parafilm verschlossen und 5 min im Dunkeln bei RT inkubiert, damit der Sauerstoff durch den Enzym-Mix entfernt werden konnte. Anschließend wurde die Probe bei unterschiedlichen Belichtungsdauern mit Licht einer Wellenlänge von 670 nm belichtet. Die Belichtung erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenz-Spektrometers FluoroMax 2 (Jobin Yvon) unter einer Anregungsspaltbreite von 7,5 nm. Direkt nach jeder Anregung erfolgte die Aufnahme des Absorptionsspektrums von 350 – 900 nm. Über den Extinktionskoeffizienten bei 605 nm ($13.700 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) konnte die Konzentration an reduziertem Methylviologen bestimmt werden (Watanabe, 1982).

2.4.11 TiO₂-Platten

2.4.11.1 Herstellung von TiO₂-Platten

Die ersten Versuche zur Belegung von TiO₂-Platten mit LHCII-Trimeren erfolgten an mit Indium-Zinnoxid (ITO) beschichteten Glasscheiben (Pilkington), auf die eigenhändig eine TiO₂-Schicht aufgetragen wurde. Hierfür wurde TiO₂ (P25, Degussa AG, Darmstadt) in Wasser und Essigsäure aufgebrosen und unter Zugabe von Detergenz zu einer cremigen Paste gerührt. Diese wurde zu einer ca. 50 μ m breiten Schicht auf die leitfähige Seite des ITO-Glas aufgetragen, getrocknet und im Muffelofen gesintert. Das genaue Protokoll zur Herstellung dieser TiO₂-Platten ist in der Doktorarbeit von Lion (2005) zu finden.

Weitere FTO-beschichtete TiO₂-Platten wurden von der AG Müllen am MPI für Polymerforschung in Mainz bezogen oder bei der Firma Solaronix (*Titania Electrodes, transparent, Ref. 74111*) bestellt.

2.4.11.2 Adsorption von LHCII-Hybrid-Komplexen auf TiO₂-Platten

Die Adsorption von LHCII-Trimeren an das TiO₂ erfolgt über eine Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Protein und dem TiO₂. Dazu wurde eine LHCII-Lösung auf die TiO₂-Platte pipettiert und über Nacht bei 8 °C inkubiert. Nach einigen Versuchen zur Beladung mit LHCII erwies sich eine Belegungsdichte mit 1 nmol/cm² an Protein-Lösung als optimal (bei einer Schichtdicke des TiO₂ von ca. 50 μ m). Nach der

Inkubation über Nacht wurde die Platte mit zwei mal 200 μ l Puffer gewaschen und der Waschüberstand zur Ermittlung der LHCII-Konzentration herangezogen. So konnte indirekt auf die Menge des an das TiO₂ gebundenen LHCII geschlossen werden. Die reine LHCII-Lösung (also ohne QDs) befand sich in einem Puffer aus 0,6 M Saccharose, 0,1 % LM und 5 mM Tris/HCl pH 7,5. Für die Adsorption von LHCII-QD-Hybridkomplexen wurde auf 50 mM NaP pH 8,5 als Puffer zurückgegriffen. Das Verhältnis der LHCII-Trimere zu QDs betrug 1 zu 1.

Die Beladung der TiO₂-Platten mit TDI_{Gs} und LHCII erfolgte in zwei separaten Schritten. Zunächst wurde die Platte für eine kurze Zeit in den in organischem Lösungsmittel befindlichen Farbstoff getunkt. Je länger sich die Platte in der TDI_{Gs}-Lösung befand, desto höher war die Belegungsdichte mit Farbstoff, eine genaue Bestimmung der Menge an adsorbiertem Farbstoff war jedoch nicht möglich. Das Lösungsmittel wurde durch Abdampfen entfernt, anschließend die LHCII-Lösung aufgetragen und die Menge an gebundenem LHCII wie oben beschrieben ermittelt.

2.4.11.3 Spektroskopische Untersuchung der TiO₂-Platten

Alle hier verwendeten TiO₂-Platten waren nicht transparent, so dass die Aufnahme von Absorptionsspektren der Platten nicht möglich war. Dagegen konnten Fluoreszenzspektren zur Detektion der LHCII-Fluoreszenz aufgenommen werden. Hierzu wurde die Front-Face-Anordnung im Fluoreszenzspektrometer (Fluoromax2, Jobin Yvon) gewählt und die Platte vorsichtig auf ein kleines Styropor-Stück vor die Küvetten-Halterung gestellt, so dass das Anregungslicht direkt auf die mit LHCII belegte TiO₂-Schicht fiel. Die Messparameter zur Aufnahme der Emissionsspektren sind unter 2.6.2.1 beschrieben.

Die Aufnahme von Wirkungsspektren der mit LHCII und/oder QD bzw. Farbstoff beladenen TiO₂-Platten wurde von Yanfei Zhao aus der AG von Prof. Dr. Müllen am MPI für Polymerforschung in Mainz durchgeführt.

2.4.11.4 Versuche zur Integration von LHCII in Hcp1

Das Ringprotein Hcp1 wurde von Andreas Schreiber (AG Schiller, FRIAS) zur Verfügung gestellt (in 125 mM NaCl und 12,5 mM Tris/HCl pH 7,5). Für die Versuche zur Integration des LHCII in das Ringprotein Hcp1 wurden LHCII-Trimere und Hcp1 in 125 mM NaCl und 12,5 mM Tris/HCl pH 7,5 vermischt. Es wurden Proben hergestellt mit einem Überschuss des Hcp1-Proteins zu LHCII von 2, 8 und 24. Die LHCII-Konzentration in den 500 μ l-Ansätzen betrug 2 μ M (bezogen auf Monomere), die Konzentration des LM betrug ca. 0,05 %. Als Kontrollproben wurden die gleichen Ansätze mit BSA statt Hcp1 hergestellt. Nach einer guten Durchmischung der Proben wurde das Detergenz durch Zugabe von jeweils 30-40 mg *BioBeads* (BioRad) entzogen. Die Proben wurden hierfür 2 h bei 4°C im Dunkeln auf dem Drehrad

inkubiert, dann wurden die alten *BioBeads* durch frische in der gleichen Menge ersetzt und die Proben erneut für ca. 12 h auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden alle Proben für 2 Tage auf Eis inkubiert. Die Proben wurden zu allen Zeitpunkten fotografisch dokumentiert. Nach der 2. und 3. *Biobeads*-Inkubation wurden die Proben mittels der Aufnahme von Absorptions- (2.6.1.1), Fluoreszenz- (2.6.2.1) und CD-Spektren (2.6.3) spektroskopisch untersucht.

2.5 Analytisch biochemische Methoden

2.5.1 Pigmentanalyse mittels HPLC

Bei der *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) handelt es sich um eine Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie, mit deren Hilfe auch kleine Mengen an Stoffgemischen auf ihre qualitative Zusammensetzung und deren quantitativen Anteile untersucht werden können. Bei der hier angewendeten *reverse phase* Chromatographie wird die zu untersuchende Probe in einem polaren Laufmittel, auf eine unpolare C₁₈-Sephärose Trennsäule gegeben. Unpolare Stoffe haben hier eine wesentlich längere Retentionszeit als polare Stoffe, die schneller mit dem Elutionsmittel, einem von 70 auf 100% ansteigenden Aceton-Gradienten, von der Säule diffundieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die HPLC genutzt, um Stöchiometrie und Quantität der Pigmente im Pigmentextrakt zu ermitteln. Hierzu wurde Pigmentextrakt in 100 % Aceton mit 80% Aceton verdünnt, bis die Lösung noch schwach grün erschien. Nach Reinigung der C₁₈-Säule durch zwei Durchläufe mit 80 % Aceton wurde die Probe mit Hilfe einer Hamilton-Spritze über die Injektionsschleife auf die Säule gegeben. Über die Injektionsschleife werden exakt 20 µl der Probe auf die Säule gegeben, somit können quantitative Aussagen gemacht werden. Die nacheinander eluierten Fraktionen wurden photometrisch analysiert und die Elutionspeaks bei 440 nm integriert. Die Bestimmung der Bestandteile und deren Konzentrationen erfolgte mit Hilfe der Software BORWIN (Jasco, Groß Umstadt). Vor dem Auftragen der nächsten Probe wurde die Probenschleife mit 2x 80 % Aceton gespült, nach Beendigung der Messungen wurde die Säule durch mehrere Leerläufe mit 80 % Aceton von möglichen Pigmentresten befreit.

2.5.2 Gelelektrophorese

Um Proteingemische voneinander zu trennen, wurde sich der Polyacrylamidgelelektrophorese, kurz PAGE, bedient. Je nach Konzentration des Polyacrylamids und des Vernetzers Bisacrylamid entsteht ein Gel mit einer bestimmten Porenweite, in dem die Proteine in einem elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer Ladung und Größe voneinander getrennt werden.

Um LHCII-Apoprotein bzw. denaturierte LHCII-Komplexe zu untersuchen, wurde eine denaturierende Gelelektrophorese (2.5.2.2) angewendet. Sollten jedoch der LHCII als intakter Komplex untersucht werden, um z.B. eine Kontamination einer Trimer-Probe mit Monomeren auszuschließen, wurde eine schwach denaturierende Gelelektrophorese (2.5.2.3) durchgeführt.

2.5.2.1 Herstellung von Polyacrylamidgelen

Die verwendeten Polyacrylamidgele setzen sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen (Laemmli, 1970). Dabei dient das weitporigere Sammelgel dem Anhäufen der Proteine, so dass sie gemeinsam in das Trenngel einlaufen um dort entsprechend ihrer Ladung bzw. Größe aufgetrennt zu werden. Die genaue Herstellung der PA-Gele kann der Dissertation von Gundlach (2010) entnommen werden.

2.5.2.2 Denaturierende SDS-PAGE

Der Laufpuffer für die Gelelektrophorese wie auch der Puffer zur Denaturierung der Proteinproben (Sparmix) enthalten Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS). Dieses lagert sich gleichmäßig an die Proteine an, denaturiert diese und verleiht ihnen eine ihrer Größe entsprechende, negative Ladung. Die spezifische Eigenladung der Proteine wird somit überdeckt und die Auftrennung der Proteine erfolgt nun entsprechend ihrem Molekulargewicht. Mit Hilfe von bekannten Markerproteinen kann durch einen direkten Vergleich die molekulare Masse der Proteine abgeschätzt werden.

Die Gelelektrophorese wurde in einer Vertikalanlage bei RT durchgeführt. Der Laufboden und die Geltaschen wurden mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt. Die Proben (ca. 2 µg Protein) wurden vor dem Auftrag zur Denaturierung mit ca. ¼ des Probenvolumens an Sparmix versetzt, 1 min gekocht und kurz anzentrifugiert. Nachdem die Taschen gut mit Puffer gespült waren, wurden die Proben mit einer Hamilton-Spritze aufgetragen. Mindestens eine Tasche wurde mit ca. 3 µl SDS-7 Marker beladen. Die Proben durchliefen das Sammelgel zunächst für ca. 20 min bei 80 V bevor die Spannung auf 180 V erhöht wurde. Gestoppt wurde das Gel, wenn sich die Laufmittelfront ca. einen Fingerbreit vor dem unteren Ende des Gels befand.

3-4x Sparmix: 100 mM Tris/HCl (pH 6,8)
1,4 M β-ME
4 % (w/v) SDS
24 % (w/v) Glycerin
0,4 mM Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS
0,5 mM EDTA

2.5.2.3 Schwach denaturierende Gelelektrophorese

Um LHCII-Komplexe in ihrer nativen Struktur untersuchen zu können, wurde eine schwach denaturierende oder auch „native“ Gelelektrophorese nach Peter und Thornber (1991) durchgeführt. Mit dieser Methode war es z.B. möglich eine LHCII-Trimer-Probe auf eine Kontamination mit freien Pigmenten oder LHCII-Monomeren zu überprüfen. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass die Proben vor dem Auftragen nicht denaturiert werden und statt des SDS-Laufpuffers ein weniger denaturierend wirkender LDS-Laufpuffer oder Deriphat-Puffer eingesetzt wird. Dabei ist der Deriphat-Puffer noch schonender für die LHCII-Komplexe als der LDS-Puffer, jedoch ist letzterer wesentlich unkomplizierter in der Herstellung. Daher wurde der LDS-Puffer besonders dann eingesetzt, wenn nur eine qualitative Aussage getroffen werden sollte. Es wurden 10 % Polyacrylamidgele verwendet und die Gelapparatur zum Schutz der Komplexe an ein Kühlsystem angeschlossen. Zum Beschweren wurden die Proben vor Auftrag mit ca. 1/10 des Probenvolumens an 80 % Glycerin versetzt.

LDS-Laufpuffer:
25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % (w/v) LDS
0,5 mM EDTA

Deriphat-Puffer:
0,15 % (w/v) Deriphat
48 mM Glycin
12 mM Tris

2.5.2.4 Proteinfärbung mit Coomassie

Um die Proteine auf dem SDS-Gel sichtbar zu machen, wurden die Gele für 20-30 min auf dem Schüttler in einer Coomassie-Färbelösung inkubiert. Dabei lagert sich Coomassie an basische Aminosäuren an, so dass die Färbung annähernd proportional zur Proteinmenge ist. Anschließend wurden die Gele für 30-60 min in die 1. Entfärberlösung und für mindestens 1 h in die 2. Entfärberlösung, ebenfalls auf dem Schüttler, gegeben, um unspezifische Färbungen wieder herauszuwaschen. Zur Entfernung der Essigsäure wurden die Gele abschließend mehrfach mit destilliertem Wasser abgewaschen. Nachdem die Gele fotografiert wurde, konnten sie mithilfe einer Vakuumpumpe und Wärme zwischen zwei Einmachfolien getrocknet werden.

Coomassie-Färbelösung:
0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue
(Serva, Heidelberg)
40 % (v/v) Ethanol
7 % (v/v) Essigsäure

- 1. Entfärberlösung:** 10 % (v/v) Ethanol
7 % (v/v) Essigsäure
- 2. Entfärberlösung:** 10 % (v/v) Essigsäure

2.6 Analytisch spektroskopische Methoden

2.6.1 Absorptionsspektroskopie

Bei der Absorptionsspektroskopie macht man sich zunutze, dass verschiedene Moleküle Licht unterschiedlicher Wellenlänge charakteristisch aufnehmen. So können Stoffe in einer Probe nachgewiesen werden und bei Kenntnis des Extinktionskoeffizienten auch die Konzentration des Stoffes in einer Probe ermittelt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden für Absorptionsmessungen Zweistrahlphotometer verwendet. Dabei wird das zur Messung benötigte Licht zunächst geteilt und dann gleichzeitig auf einen Proben- und einen Referenzkanal geworfen. In letzteren wird eine Küvette mit einer Lösung gestellt, die alle Bestandteile bis auf die zu bestimmende Substanz enthält. In dem das Referenzspektrum von dem Probenspektrum abgezogen wird, erhält man Absorptionsspektrum der relevanten Probe.

Vor Beginn der Absorptionsmessungen wurde stets ein Lampenspektrum (*Baseline*) aufgenommen, um lichtbedingte Unterschiede im Proben- und Referenzkanal auszumachen. Dieses wurde von allen folgenden Absorptionsspektren automatisch abgezogen. Es wurde darauf geachtet, dass die Proben im messrelevanten Bereich möglichst eine OD zwischen 0,01 und 1,2 aufwiesen. Sonst konnte es zu einem ungünstigen Signal/Rausch-Verhältnis kommen bzw. war die Absorption nicht mehr zwingend linear zu Probenkonzentration. Für Messungen im UV-Bereich mussten Quarzglasküvetten verwendet werden, da die sonst verwendeten optischen Spezialglasküvetten UV-Licht nicht ungefiltert durchlassen. Die allgemeinen Messparameter für die Aufnahme von Absorptionsspektren sind in Tabelle 2.8 zu finden.

Tabelle 2.8 Messparameter zur Aufnahme von Absorptionsspektren

Parameter	Einstellung
Response	Fast
Band Width	1,0 nm
Scan Speed	200 nm/min
Data Pitch	1 nm

2.6.1.1 Allgemeine Konzentrationsbestimmung über den Extinktionskoeffizienten

Die Extinktion (E) eines Stoffes ist laut des Lambert-Beerschen-Gesetz abhängig von der Konzentration (c), dem Extinktionskoeffizienten (ϵ) und der Schichtdicke der Küvette (d). Ist

der Extinktionskoeffizient bei einer bestimmten Wellenlänge (λ) eines Stoffes bekannt, kann also über die Messung der Extinktion die Konzentration des Stoffes in einer Probe bestimmt werden:

$$c \text{ [mol/l]} = \frac{E_{\lambda}}{(\varepsilon_{\lambda} * d)}$$

Der Extinktionskoeffizient des LHCII beträgt $\varepsilon_{670} = 546.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Butler, 1988), so dass die Konzentration von reinen LHCII-Komplexen einfach über die Absorption bei 670 nm bestimmt werden kann. Die Extinktionskoeffizienten der in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe können der Tabelle 2.2 entnommen werden, der von reduziertem Methylviologen ist unter 2.2.8 zu finden.

2.6.1.2 Bestimmung des Chlorophyllgehalts von Pigmentextrakt

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes eines Pigmentextrakts erfolgte nach Porra et al. (1989) in 80% Aceton. Dazu wurde, nachdem die Absorption bei 750 nm auf Null eingestellt war, die Absorption der Probe bei den Wellenlängen 663,6 und 646,6 nm ermittelt. Darüber konnten die Chlorophyll-*a* bzw. -*b* -Konzentrationen wie folgt bestimmt werden:

$$\text{Chl } a = 12,25 \times A_{663,6} - 2,55 \times A_{646,6} = [\mu\text{g/ml}] * \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{Chl } b = 20,31 \times A_{646,6} - 4,91 \times A_{663,6} = [\mu\text{g/ml}] * \text{Verdünnungsfaktor.}$$

2.6.1.3 Konzentrationsbestimmung von LHCII-Apoprotein

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von LHCII-Apoprotein erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm, da hier die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin absorbieren. Hierfür wurden 10 μl Apoprotein (IBs) in 990 μl A_{280} -Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proteine durch 1-minütiges Aufkochen denaturiert. Als Referenz diente der gleiche Ansatz, jedoch mit 10 μl Trispuffer statt der Proteinlösung.

Eine OD_{280} von 0,1 entspricht dabei 53 $\mu\text{g/ml}$ LHCII-Apoprotein, so dass die Proteinkonzentration in der Stammlösung wie folgt berechnet wurde:

$$c \text{ [mg/ml]} = \frac{A_{280} * 530 [\mu\text{g / ml}] * f}{1000 * d}$$

f = Verdünnungsfaktor, d = Schichtdicke [cm].

2x A_{280} -Puffer:

20 mM Tris/HCl (pH 6,8)

4 % (w/v) SDS

1 mM β -Mercaptoethanol

2.6.2 Fluoreszenzspektroskopie

Viele Moleküle haben die Eigenschaft nach Anregung mit Licht einen Teil ihrer Anregungsenergie in Form von Fluoreszenzlicht wieder abzugeben (siehe 1.4.1). Dies macht man sich in der Fluoreszenzspektroskopie zunutze, um z.B. einen Fluoreszenz- (oder Förster-) Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen zwei Stoffen zu untersuchen. Aufgrund der besonderen Anordnung der Chlorophylle im LHCII-Komplex lässt sich mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie auch eine Aussage über die korrekte Faltung des LHCII treffen. Eine besondere Form des FRET ist der Lumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (LRET), bei dem (in der Regel) das Donor-Molekül in der Lage ist zu lumineszieren. Für die Aufnahme von Emissionsspektren wurde eine Probe bei einer Wellenlänge angeregt und die Emission über eine Bandbreite von Wellenlängen detektiert. Es konnten aber auch sogenannte Exzitations- oder Anregungsspektren aufgenommen werden, wobei die Probe nacheinander bei verschiedenen Wellenlängen angeregt und die Emission bei nur einer Wellenlänge detektiert wurde.

In dieser Arbeit wurden alle FRET-Untersuchungen und die Überprüfung der LHCII-Komplexe auf Intaktheit (2.6.2.1) am Fluoreszenzspektrometer Fluoromax (Jobin Yvon) durchgeführt. Hier konnte grundsätzlich zwischen einer Front-Face- und einer 90°-Anordnung zur Vermessung der Proben gewählt werden. In der Regel wurde die 90°-Anordnung gewählt, bei der die Anregung der Probe im 90°-Winkel zur Detektion der Emission erfolgt. Nur für sehr hoch konzentrierte (dunkelgrüne) LHCII-Proben kam die *Front-Face*-Anordnung zum Einsatz, da es sonst aufgrund der hohen Chlorophylldichte in den Proben zu Reabsorptionsereignissen kam, die zu verfälschten Emissionsspektren führen konnten. Bei der *Front-Face*-Anordnung wird nur die Emission der vorderen Probenfront vermessen. Alle Messungen erfolgten bei RT in 5 mm dicken Glasküvetten. Aufgrund einer wellenlängenabhängigen Empfindlichkeit des Sensors zur Detektion der Emission wurden alle Emissionsspektren mit dem gerätespezifischen Faktor „mcorrect“ verrechnet.

LRET-Messungen (2.6.2.3) von wurden am InfiniteR M1000 (Tecan) durchgeführt, da dieses Gerät in der Lage ist, eine Wartezeit zwischen Anregung der Probe und der Aufnahme der Emission einzulegen. So konnten gezielt die Lumineszenz-Eigenschaften der Proben untersucht werden. Die Proben wurden ausschließlich in UV-durchlässigen 96-Well-Platten (UV-Star, 96-well, flat bottom, Greiner) vermessen.

2.6.2.1 Überprüfung der LHCII-Faltung und Energietransfer-Messungen

Um die korrekte Faltung der LHCII-Komplexe zu überprüfen bzw. Energietransfermessungen zum oder vom LHCII zu untersuchen, wurden überwiegend die in Tabelle in Tabelle 2.9 zusammengefassten Messparameter verwendet. Die Messungen wurden am Fluoromax2 (Jobin Yvon) bei RT durchgeführt.

Tabelle 2.9 Messparameter zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren. AF = Akzeptorfarbstoff; DF = Donorfarbstoff.

Proben	Exzitation	Emission	Inkrement	Integrations- zeit	Spaltbreite	
					Ex	Em
LHCII-Faltung	470 nm	600-750 nm	1 nm	0,5 sec	2 nm	2 nm
LHCII + Typ I QDs	360 nm	500-750 nm	1 nm	0,5 sec	3 nm	4 nm
Exzitationsspektren	360-670 nm	680 nm	1 nm	0,1 nm	3 nm	4 nm
LHCII + Typ II QDs;	470 nm	600-	1 nm	0,5 sec	3 nm	4 nm
LHCII + AF		850/900 nm				
Exzitationsspektren	400-770 nm	780 nm	1 nm	0,1 nm	3 nm	4 nm
LHCII und DF	550 nm	560-750 nm	1 nm	0,5 sec	3 nm	4 nm

2.6.2.2 Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen

Alle zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen von Hybridkomplexen aus LHCII und Typ-I bzw. Typ-II QDs wurden von Dr. Mathias Haase (AG Prof. Basché, Institut für Physikalische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt. Eine genaue Beschreibung der verwendeten Apparatur und der Messparameter ist in Werwie (2012) zu finden.

2.6.2.3 Lumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (LRET)-Messungen

Nach der Markierung des LHCII mit Lanthanoiden wurden Lumineszenzspektren zur Untersuchung des LRET aufgenommen. Die Messungen erfolgten am InfiniteR M1000 (Tecan) bei RT, die Messparameter können der Tabelle 2.10 entnommen werden.

Tabelle 2.10 Messparameter zur Aufnahme von Lumineszenzspektren.

Messparameter	LHCII + Lanthanoid-	LHCII + EuCl ₃ bzw. TbCl ₃
	Maleimide	
Excitation	228 nm	280 nm
Emission	450-750 nm	450-750 nm
Bandwidth Ex	20 nm	20 nm
Bandwidth Em	5 nm	5 nm
Number of flashes	20-50	20-50
Flash frequency	100 Hz	100 Hz
Integration time	200 μ s	200 μ s
Lag time	100-200 μ s	100-200 μ s

Achtung: Die für diese Messungen verwendeten 96-Well-Platten (UV-Star, 96-well, *flat bottom*, Greiner) besitzen nach Anregung bei 280 nm eine starke Eigenfluoreszenz bei ca. 560 nm.

2.6.3 Circular-Dichroismus-Spektroskopie

Bei der Circular-Dichroismus (CD)-Spektroskopie kommt die Eigenschaft chiraler Moleküle, links- und rechtszirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark zu absorbieren, zum Tragen. In der vorliegenden Arbeit wurde die CD-Spektroskopie genutzt, um exzitonic gekoppelte Chlorophylle in LHCII-Komplexen nachzuweisen. Dabei ergeben sich für LHCII-Monomere und -Trimere charakteristische Signale (Hobe, 1994). Während der CD-Messung wird die LHCII-Probe nacheinander mit links- und rechtszirkular polarisiertem Licht bestrahlt und anschließend die Differenz der beiden Spektren abgebildet. Als Basislinie wurde das Spektrum des reinen Puffers aufgenommen und vom Probenspektrum abgezogen. Die genauen Messparameter können der Tabelle 2.11 entnommen werden.

Tabelle 2.11 Messparameter zur Aufnahme von CD-Spektren.

Messparameter	Einstellung
Wavelength	400-750 nm
Data pitch	1 nm
Response	4 sec
Band Width	4 nm
Accumulation	1
Sensitivity	Standard
Scanning speed	100 nm/min
Temperatur	4 °C
N ₂ -Fluss	2 l/min

2.7 FRET-Berechnungen

2.7.1 Dekonvolution von Fluoreszenzspektren

Zur Untersuchung des Energietransfers in LHCII-Hybridkomplexen mit QDs oder Farbstoffen wurden mehrfach Fluoreszenzspektren aufgenommen. Dabei überlappten die Emissionsspektren der beteiligten Komponenten häufig. Um die Anteile der einzelnen Komponenten am Summenspektrum ermitteln zu können, wurde daher eine 2-Faktorenanalyse zur Dekonvolution der Emissionsspektren durchgeführt. Der genaue Vorgang kann Boggasch (2006) oder Gundlach (2010) entnommen werden.

2.7.2 Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten

Die Fluoreszenzquantenausbeute (Φ) eines Fluorophors ist das Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen. Besitzt ein Stoff eine Quantenausbeute von 50 %, wird die Hälfte der Photonen, die er absorbiert hat, wieder als Fluoreszenzlicht emittiert. In der Regel ist das

emittierte Licht energieärmer als das vorher absorbierte. Für die Bestimmung der Quantenausbeuten gilt im Allgemeinen, dass ein Fluorophor in unterschiedlichen Umgebungen verglichen werden kann, oder zwei verschiedenen Fluorophore in gleicher Umgebung.

Um die Quantenausbeute eines Stoffes zu ermitteln, wurde der Vergleich mit einem Stoff, dessen Quantenausbeute bekannt ist und dessen Absorptionsspektrum mit dem des zu untersuchenden Stoffes überlappt, herangezogen. Die zwei Stoffe wurden in ihrer Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge auf den gleichen Wert eingestellt, anschließend bei dieser Wellenlänge mit möglichst kleiner Spaltbreite angeregt und Emissionsspektren aufgenommen. Aus dem Verhältnis der Integrale beider Fluoreszenzspektren konnte die gesuchte Fluoreszenzquantenausbeute unter Einbeziehung der bekannten Quantenausbeute wie folgt berechnet werden:

$$\Phi_{\text{gesucht}} = \Phi_{\text{bekannt}} * \frac{\int \text{Fluoreszenz}_{\text{gesucht}}}{\int \text{Fluoreszenz}_{\text{bekannt}}} .$$

Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem die Quantenausbeute der CdTe/3xCdSe/ZnS/DHLA-QDs bestimmt. Da diese für jede Charge bzw. je nach Probenzusammensetzung variierte und daher häufig bestimmt werden musste, wurde eine (stets verfügbare) LHCII-Lösung mit einer Quantenausbeute von 20 % als Vergleichsstoff herangezogen. Dazu wurde eine QD-Lösung mit der identischen Pufferzusammensetzung wie die LHCII-Lösung hergestellt. (Anmerkung: Befand sich TCaEP im Puffer, kam es zu einer massiven Verstärkung der Quantenausbeute aller verwendeten QDs, siehe dazu 3.1 und 3.2).

2.7.3 Berechnung von Försterradien

Der Försterradius (R_0) gibt den Abstand zwischen zwei Stoffen an, bei dem ein FRET mit einer Effizienz von 50 % abläuft. Ist der Abstand zwischen zwei gekoppelten Stoffen bekannt, kann mit Hilfe des Försterradius der zu erwartende Energietransfer bestimmt werden (2.7.4).

Um den Försterradius zweier Stoffe ermitteln zu können, muss deren Überlappungsintegral $J(\lambda)$, die Fluoreszenzquantenausbeute (Φ) des Donors und der Brechungsindex der Umgebung (η) bekannt sein. Außerdem spielt die Orientierung der Dipolmomente (κ) mit in die Berechnung ein:

$$R_0 [nm] = 0.0211 [\kappa^2 * \eta^{-4} * \Phi * J(\lambda)]^{1/6} .$$

Die Berechnung von Försterradien erfolgte im Rahmen dieser Arbeit stets für Hybridkomplexe mit LHCII. Da die Dipolmomente der 14 Chlorophylle im LHCII alle eine unterschiedliche Orientierung besitzen, wurde für $\kappa = 2/3$ eine zufällige Orientierung angenommen. Der Brechungsindex für Proteinumgebungen wurde mit 1,54 festgelegt (Sauer, 1987). Das Überlappungsintegral beschreibt die Überlappung der Donorfluoreszenz (F_D) mit der Absorption des Akzeptors und wurde wie folgt berechnet:

$$J(\lambda) = \left[\int F_D(\lambda) * \varepsilon_A * \lambda^4 d\lambda \right] / \left[\int F_D(\lambda) d\lambda \right] \quad .$$

Dabei ist ε_A der Extinktionskoeffizient des Akzeptors und λ die Wellenlänge. Die Bestimmung von R_0 für LHCII und die CdTe/CdSe/Zns/DHLA-QDs ist in 3.5.1 beschrieben.

2.7.4 Bestimmung des zu erwartenden Energietransfers

Wenn der Abstand zwischen zwei gekoppelten Molekülen und der zugehörige Försterradius R_0 (2.7.3) bekannt war, konnte der zu erwartende Energietransfer ET_{soll} wie folgt bestimmt werden.

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

2.7.5 Berechnung der Energietransfereffizienz

Um die Energietransfereffizienz (ET) zwischen zwei Stoffen auszudrücken, wurde die Fluoreszenzlöschung des Donors herangezogen. Um diese bestimmen zu können, musste das Fluoreszenzspektrum des Donors in Ab- (F_D) und in Anwesenheit (F_{DA}) des Akzeptors bei jeweils gleicher Konzentration des Donors aufgenommen werden. Anschließend wurden die Flächen der beiden Emissionsspektren des Donors integriert und die Energietransfereffizienz wie folgt berechnet:

$$ET [\%] = 1 - \frac{\int F_{DA}}{\int F_D} * 100 \quad .$$

Unter Umständen war aufgrund einer Überlappung der Emissionsspektren von Donor und Akzeptor eine Dekonvolution des Summenspektrums notwendig (2.7.1).

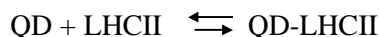
2.7.6 Bestimmung der FRET-Plausibilität

Die zur Quantifizierung eines (möglichen) Energietransfers herangezogene Löschung der Donorfluoreszenz (2.7.5) könnte auch andere Ursachen (als einen Energietransfer) haben. Zu diesen Zwecken wird die FRET-Plausibilität bestimmt, die angeben soll, wie wahrscheinlich die Löschung der Donorfluoreszenz auf einen Energietransfer nach der FRET-Theorie zurückzuführen ist. Zur Bestimmung dieser FRET-Plausibilität wird auch die stimulierte Akzeptorfluoreszenz herangezogen und unter Berücksichtigung der Quantenausbeuten (QA) von Donor und Akzeptor geschaut, ob es eine Korrelation zwischen der Fluoreszenzlöschung des Donors (A_D) und dem Fluoreszenzzuwachs des Akzeptors (A_A) gibt. Die Plausibilität für eine Löschung der Donorfluoreszenz aufgrund von FRET ist umso höher, je besser das Verhältnis der QA von Donor und Akzeptor mit dem Verhältnis der Flächen aus Fluoreszenzlöschung und Akzeptorzuwachs übereinstimmt:

$$\frac{A_A}{A_D} = \frac{\Phi_A}{\Phi_D} .$$

2.8 Bestimmung von apparenten Bindekonstanten

Über die apparente Bindekonstanten sollte eine Aussage getroffen werden, wie hoch die verschiedenen Affinitätssequenzen am LHCII zu den CdTe/CdSe/ZnS/DHLA-QDs sind. Dabei wurde davon ausgegangen, dass es sich bei der Bindung um eine Gleichgewichtsreaktion handelt:



Die apparente Bindekonstante wurde in dieser Arbeit in Form der Assoziationskonstante K_a bestimmt:

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

Um also die Konstante berechnen zu können, musste die Konzentration der gebundenen Komplexe und der frei vorliegenden einzelnen Komponenten ermittelt werden. Hierfür wurden zwei verschiedene Strategien angewandt. Zum einen sollte die Bindekonstante aus den Ultrazentrifugationsversuchen (2.4.9.2) ermittelt werden. Hier wurden die an QDs gebundenen LHCII-Komplexe durch Ultrazentrifugation von freiem LHCII getrennt und die LHCII-Konzentration in den verschiedenen Fraktionen durch Absorption bestimmt. Es wurde davon

ausgegangen, dass nur ein LHCII (-Trimer) an einen QD binden kann, so dass die Menge an gebundenen Trimeren auch der Menge an gebundenen QDs entsprach.

Zum anderen wurde die Bindekonstante über FRET-Analysen bestimmt. Hier wurde der prozentuale Anteil des an QD gebundenen LHCII über den Vergleich der LHCII-Fluoreszenzlöschung in 1 zu 1 Mischungen mit der maximalen Fluoreszenzlöschung in einer mit QDs gesättigten Lösung, berechnet. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die maximale Fluoreszenzlöschung des LHCII bedeutet, dass alle LHCII-Komplexe gebunden vorliegen. Über einen Dreisatz wurde dann anhand der prozentualen Löschung der LHCII-Fluoreszenz in 1 zu 1 Ansätzen auf den Prozentsatz an gebundenen Komplexen geschlossen. Diese Versuche wurden mit LHCII-QD-Hybridkomplexen bei einer QD-Konzentration von 15 nM und 1,5 nM gemacht und die Bindekonstanten berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Stabilisierung der Fluoreszenz von Typ-I QDs in wässriger Lösung

Bislang wurde am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Mainz im Rahmen mehrerer Abschlussarbeiten mit verschiedensten Typ-I Quantum Dots (QDs) gearbeitet, die alle in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Thomas Basché am Institut für physikalische Chemie hergestellt wurden. Dabei unterschied sich nicht nur die Zusammensetzung der Kerne und der Hüllschichten, sondern auch die Auswahl der Liganden, die den QDs ihre wasserlöslichen Eigenschaften verleihen. Für die Untersuchung des Energietransfers zwischen QDs und anderen Fluorophoren, im vorliegenden Fall dem Lichtsammelkomplex II (LHCII), ist neben bestimmten spektroskopischen Eigenschaften und einer stabilen Fluoreszenz der QDs auch ein möglichst kleiner Durchmesser von besonderem Interesse. Es hat sich gezeigt, dass QDs mit

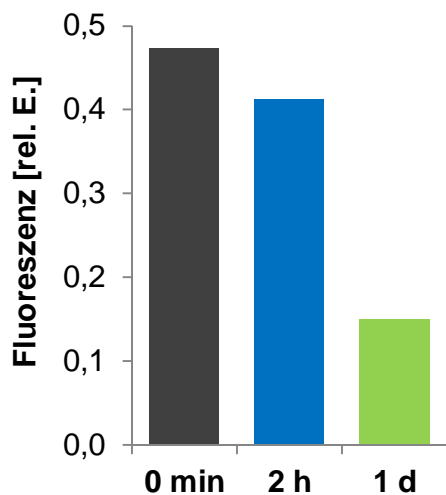


Abb. 3.1 Abnahme der Fluoreszenz verdünnter Typ-I QDs in Abhängigkeit von der Zeit. Fluoreszenzmaxima einer 15 nM QD-Lösung (CdSe/6xZnS/DHLA) in Ausgangspuffer nach Ansetzen der Probe (0 min), 2 Stunden (2 h) und 1 Tag (1 d). Anregung: 360 nm.

einem Kern aus CdSe und sechs Hüllschichten aus ZnS (Cd/6xZnS) die bislang bestmöglichen Eigenschaften bezüglich der oben genannten Kriterien aufwiesen (Gundlach, 2010). Daher wurde zu Beginn dieser Arbeit auf diese QDs zurückgegriffen. Als Ligand wurde Dihydroliponsäure (DHLA) ausgewählt, diese hatte sich ebenfalls in mehreren Versuchsreihen dieser Arbeitsgruppe bereits bewährt (Gundlach, 2010). Trotz der zahlreichen Optimierungsschritte bei der Zusammensetzung der Hüllen und Liganden führt die Verdünnung der Typ-I QDs in wässrigen Lösungen neben einer massiven Verringerung der Quantenausbeute (Daten nicht gezeigt) zusätzlich zu einer weiteren Abnahme der QD-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit (Abb. 3.1).

Eine mögliche Ursache für die geringe Konstanz der QD-Fluoreszenz könnte eine fortschreitende Oxidation der Liponsäure sein. Dabei kommt es zwischen den beiden SH-Gruppen zur Ausbildung einer Disulfidbrücke, so dass die Liganden sich nicht mehr an die QD-Oberfläche anlagern können (Algar, 2007). Insbesondere bei Verdünnungen in einem liponsäurefreien Puffer könnte dies mit der Zeit zu einer Aggregation der QDs führen. Daher war eines der ersten Ziele der Arbeit zu überprüfen, ob die Liganden durch die Zugabe von Reduktionsmitteln verstärkt vor Oxidation geschützt werden und somit die Fluoreszenz stabilisiert werden kann.

Bei bisherigen Untersuchungen von Hybridkomplexen aus QDs und LHCII bestand der Puffer aus 0,6 M Saccharose, 0,1% LM und 10 mM Natriumphosphat (NaP)-Puffer (pH 8,5). Im Folgenden wird bei dieser Zusammensetzung vom *Ausgangspuffer* gesprochen. Der Einfluss der einzelnen Puffer-Komponenten auf das Verhalten der QDs wurde bereits untersucht (Eck, 2009). Dabei konnte gezeigt werden, dass besonders der Einsatz von NaP zu einer starken Löschung der QD-Fluoreszenz führte. Aus diesem Grund sollten neben den verschiedenen Reduktionsmitteln auch weitere Puffersysteme bezüglich ihres Einflusses auf die QD-Fluoreszenz überprüft werden.

3.1.1 Einsatz von Reduktionsmitteln

Für die Untersuchung des Einflusses von Reduktionsmitteln auf die QD-Fluoreszenz wurden Typ-I QDs (15 nM) in *Ausgangspuffer* gegeben, der stets 2 mM eines bestimmten Reduktionsmittels enthielt. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität der QDs über einen Zeitraum von drei Stunden miteinander verglichen. Die Auswahl der Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol (β -ME), Dithiothreitol (DTT), Triscarboxyethylphosphin (TCaEP) und Triscyanoethylphosphin (TCyEP) orientierte sich schlicht und einfach an der Verfügbarkeit im Labor. Auch die eingesetzte Konzentration sollte lediglich sicherstellen, dass Reduktionsmittel in einem deutlichen Überschuss zu den Liganden vorhanden ist. Zudem war bereits aus Dichtegradientenversuchen mit LHCII bekannt (Wiegand, 2008), dass der Protein-Pigment-Komplex durch die Anwesenheit der Reduktionsmittel in dieser Konzentration nicht beeinflusst wird und somit ein möglicherweise mit QDs erfolgreicher Ansatz sich auch für das Arbeiten mit LHCII eignen könnte.

Im Vergleich zu QDs, die nicht mit einem Reduktionsmittel versetzt wurden, stach besonders die mit TCaEP behandelte QD-Probe durch eine fünffach verstärkte Fluoreszenz hervor (Abb. 3.2). Zwar konnte auch mit DTT und TCyEP zunächst eine Verstärkung des Fluoreszenzsignals erzielt werden, jedoch lagen diese bereits nach zwei Stunden noch unter dem Wert der Proben, die nicht mit einem Reduktionsmittel behandelt wurden. Im Vergleich hierzu führt die Zugabe von β -ME direkt zu einer Verringerung der Fluoreszenzintensität.

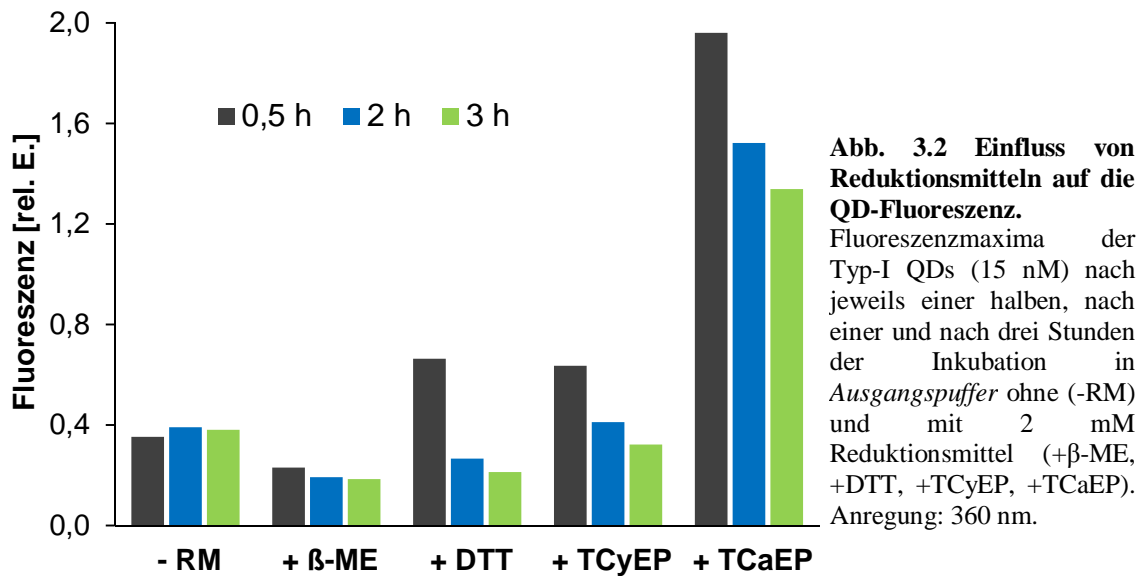


Abb. 3.2 Einfluss von Reduktionsmitteln auf die QD-Fluoreszenz.

Fluoreszenzmaxima der Typ-I QDs (15 nM) nach jeweils einer halben, nach einer und nach drei Stunden der Inkubation in Ausgangspuffer ohne (-RM) und mit 2 mM Reduktionsmittel (+β-ME, +DTT, +TCyEP, +TCaEP). Anregung: 360 nm.

Um ein optimales Verhältnis zwischen TCaEP- und QDs bestimmen zu können, wurde die QD-Fluoreszenz bei verschiedenen TCaEP-Konzentrationen (0,1 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM) und konstanter QD-Konzentration (15 nM) untersucht. Dabei zeigte sich, dass unmittelbar nach Ansetzen der Proben alle TCaEP-Konzentrationen zu einer deutlich verstärkten QD-Fluoreszenz mit vergleichbaren Intensitäten führten (Abb. 3.3). Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten ließ sich jedoch erkennen, dass bei der jeweils niedrigsten und höchsten TCaEP-Konzentration (0,1 mM + 4 mM) die QD-Fluoreszenz wieder deutlich abnahm, wohingegen die QDs bei Konzentrationen von 1 mM bzw. 2 mM TCaEP stabiler fluoreszierten. Weitere Messungen mit

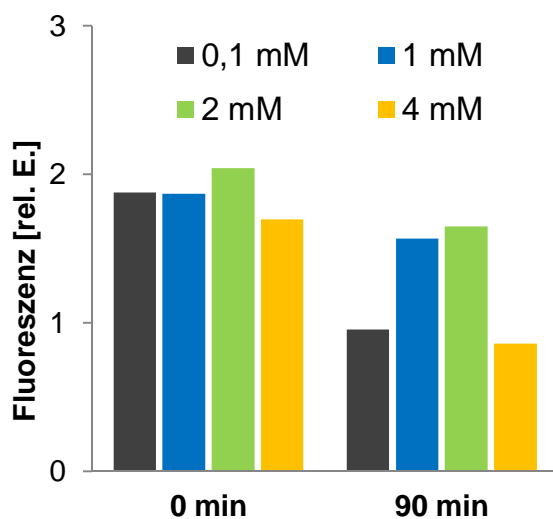


Abb. 3.3 Abhängigkeit der Typ-I QD-Fluoreszenz von der TCaEP-Konzentration.

Fluoreszenzmaxima von CdSe/6xZnS/DHLA-QDs (15 nM) bei verschiedenen TCaEP-Konzentrationen (0,1 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM) in Ausgangspuffer direkt nach Ansetzen der Proben und nach 90 Minuten. Anregung: 360 nm.

noch feineren Unterschieden in den TCaEP-Konzentrationen bestätigten ebenfalls, dass die Verwendung eines Puffers mit 2 mM TCaEP vergleichsweise zur konstantesten QD-Fluoreszenz führte (Daten nicht gezeigt).

Trotz der massiven Verstärkung des Fluoreszenzsignals bei Verwendung des Reduktionsmittel TCaEP fällt der zeitabhängige Abfall der QD-Fluoreszenz auf (vgl. Abb. 3.2). An dieser Stelle wurde der pH-Wert der entsprechenden Proben untersucht, da ein für eine gute Wasserlöslichkeit der QDs der pH-Wert der Lösung deutlich über 8,0 liegen sollte. Hier zeigte sich, dass mit TCaEP behandelte

Proben in 10 mM NaP-Puffer einen wesentlich niedrigeren pH-Wert (pH 5 - 6,5) besaßen als die Proben ohne TCaEP-Behandlung (pH 8,0). Eine Erhöhung der Puffermolarität bzw. der Test von weiteren Puffersystemen schien daher der nächste logische Schritt zu sein.

3.1.2 Variation der Pufferzusammensetzung

Zunächst einmal sollte untersucht werden, ob die schrittweise Erhöhung der Molarität des NaP-Puffers sich stabilisierend auf die Fluoreszenz von mit TCaEP behandelten QDs auswirkt. Hierfür wurden 15 nM der Cd/6xZnS/DHLA-QDs in *Ausgangspuffer* jedoch mit variierenden NaP-Puffer-Konzentrationen (10, 20 und 50 mM) und 2 mM TCaEP auf Eis inkubiert und nach mehreren Zeitabständen fluorezenzspektroskopisch vermessen (Abb. 3.4). Im Vergleich zu der QD-Probe in *Ausgangspuffer* mit 10 mM NaP zeigte die Probe mit einer 20 mM-Puffer-Konzentration neben der Verstärkung des Fluoreszenzsignals auch eine Stabilisierung dieses Signals über einen längeren Zeitraum. Nach drei Tagen der Inkubation konnte in 20 mM NaP-Puffer ein fast doppelt so hohes Quantum Dot-Fluoreszenzsignal ausgemacht werden wie in der mit TCaEP behandelten Probe mit 10 mM NaP. Die Erhöhung des NaP-Puffers auf 50 mM dagegen führte nicht zu einer weiteren Verstärkung der QD-Fluoreszenz, jedoch zu einer leichten Verbesserung der zeitabhängigen Stabilität. Aus diesem Grund wurde statt einer weiteren Erhöhung der Puffer-Konzentration zunächst einmal das Verhalten der QD-Fluoreszenz in anderen Puffersystemen wie Natrium-Borat und Tris/HCl überprüft.

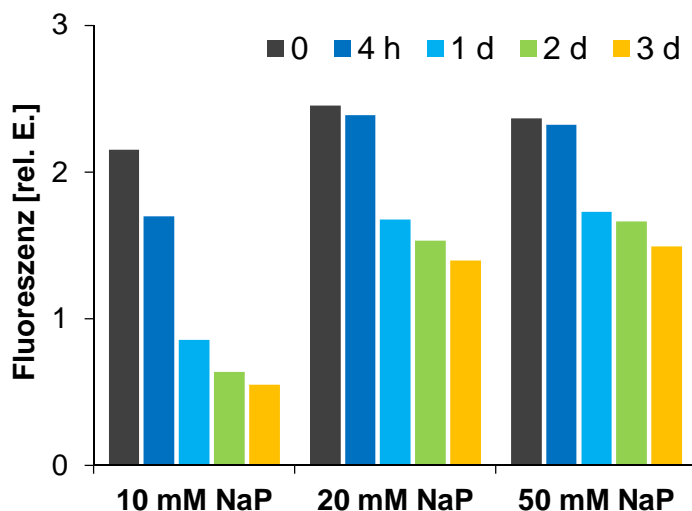


Abb. 3.4 Fluoreszenzverhalten von TCaEP-behandelten Typ-I QDs in Abhängigkeit der NaP-Pufferkonzentration. Fluoreszenzmaxima der Typ-I-QDs (15 nM) direkt nach Ansetzen (0), nach vier Stunden (4h) und nach ein, zwei bzw. drei Tagen (1d, 2d, 3d) der Inkubation in einer Pufferlösung, die neben 2 mM TCaEP, 0,6 M Saccharose und 0,1 % LM entweder 10, 20 oder 50 mM NaP₄-Puffer enthielt. Anregung: 360 nm.

Um das Fluoreszenzverhalten der CdSe/6xZnS/DHLA-QDs in Natrium-Borat-Puffer auch unabhängig von dem Einfluss des TCaEP betrachten zu können, wurden mehrere Probenansätze hergestellt. Neben einer Referenzprobe (15 nM QDs in dH₂O) bestand ein Ansatz aus QDs in 0,6 M Saccharose, 0,1 % LM und 50 mM Natrium-Borat-Puffer (pH 8,5). Der dritte Ansatz enthielt zusätzlich 2 mM TCaEP. Nach mehreren Zeitabständen wurden jeweils Emissionsspektren aufgenommen und die Fluoreszenzmaxima miteinander verglichen (Abb. 3.5).

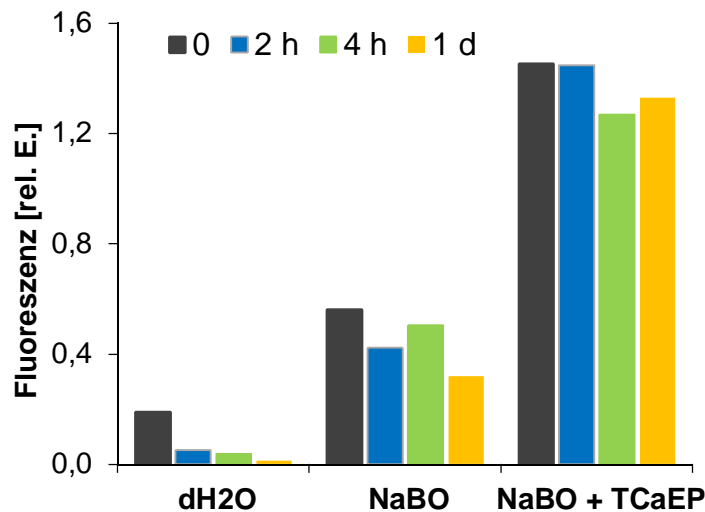


Abb. 3.5 Einfluss von Natrium-Borat-Puffer auf die Fluoreszenz der Typ-I-QDs. Fluoreszenzmaxima von 15 nM CdSe/6xZnS/ DHLA-QDs in Wasser (dH₂O), in 50 mM Natrium-Borat-Puffer (NaBO) sowie in mit TCaEP versetztem 50 mM Natrium-Borat-Puffer (NaBO + TCaEP). Die Proben wurden direkt nach Ansetzen (0), 2 Stunden (2h), 4 Stunden (4h) sowie nach einem Tag (1d) vermessen. Anregung: 360 nm.

Gegenüber der Referenzprobe, also QDs in reinem Wasser verdünnt, führt alleine die Zugabe von Natrium-Borat-Puffer mit LM und Saccharose schon zu einer Intensivierung und zeitabhängigen Stabilisierung des Fluoreszenz-Signals. Dieser Effekt wird noch einmal deutlich verstärkt, wenn die QD-Lösung zusätzlich mit TCaEP versetzt wurde. Im Vergleich zu den QD-Proben, die sich in Natrium-Phosphat-Puffer (vgl. Abb. 3.4) befanden, scheint die Fluoreszenz in Natrium-Borat-Puffer nach einem Tag deutlich stabiler zu sein. Allerdings zeigten die dazugehörigen Absorptionsspektren von QDs in Natrium-Borat-Puffer im Gegensatz zu

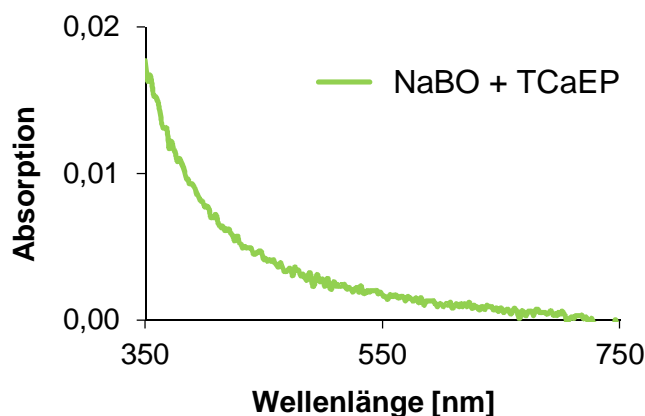


Abb. 3.6 Absorptionsspektrum von Natriumborat-Puffer nach Zugabe von TCaEP. Das Absorptionsspektrum einer Probe mit 50 mM Natrium-Borat-Puffer und 2 mM TCaEP.

Phosphat-Puffer eine ‚negative‘ Absorption im Bereich des blauen Lichts (Daten nicht gezeigt). Weitere Untersuchungen ergaben, dass das Zusammenfügen von TCaEP und Natrium-Borat-Puffer zu einem Produkt führt, das im Gegensatz zu seinen Einzelbestandteilen Absorptionseigenschaften innerhalb des sichtbaren Bereichs des Lichts besitzt (Abb. 3.6). Da aber dieser Effekt bei Referenz (Puffer und

TCaEP) und Probe (Puffer, TCaEP und QD) unterschiedlich stark zu sein scheint (Daten nicht gezeigt), ist es schwierig, die eigentliche QD-Absorption auszumachen. Daher wurde von einem weiteren Einsatz des Natrium-Borat-Puffers zusammen mit QDs zunächst einmal abgesehen.

Ein ähnlich stabilisierender Effekt auf die QD-Fluoreszenz ließ sich beobachten, wenn die

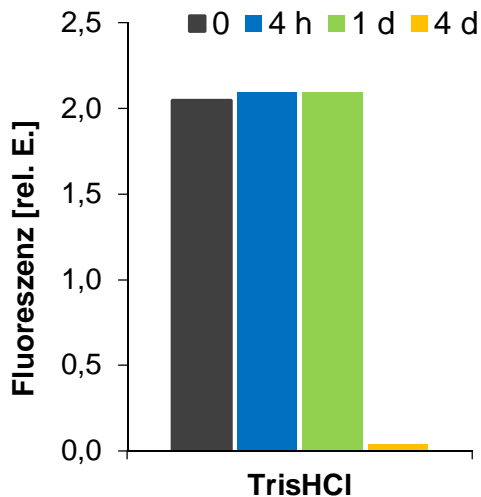


Abb. 3.7 Einfluss von Tris/HCl-Puffer auf die Typ-I QD-Fluoreszenz. Fluoreszenzmaxima von 15 nM CdSe/6xZnS/DHLA-QDs in mit 2 mM TCaEP versetztem 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5). Die Proben wurden direkt nach Ansetzen (0), vier Stunden (4h), einem Tag (1d) sowie nach vier Tagen vermessen (4d). Anregung: 360 nm.

QDs in TCaEP mit Tris/HCl-Puffer statt Natrium-Phosphat-Puffer inkubiert wurden (Abb. 3.7). Jedoch war hier nach längerer Inkubation der Proben auf Eis (ca. 3-4 Tage) zu sehen, dass die Fluoreszenz der QDs plötzlich gegen Null ging. Dieses auffällige Verhalten wurde unabhängig von der QD-Charge immer wieder beobachtet.

Aufgrund der unkontrollierbaren Absorption von TCaEP in Natrium-Borat-Puffer mit und des (späten) fluoreszenzlöschenden Effekts von Tris/HCl-Puffer auf die Typ-I QDs wurde für alle weiteren Versuche mit QDs ein Puffer verwendet, der sich aus 50 mM Natrium-Phosphat (pH 8,5), 0,6 M Saccharose und 0,1 % LM zusammensetzte. Dieser soll im Folgenden als *Standardpuffer* bezeichnet werden.

3.1.3 Analyse des Einflusses von TCaEP auf die QD-Fluoreszenz

Offensichtlich führt die Zugabe von TCaEP in Verbindung mit einem deutlichen Überschuss an Puffersubstanz zu einer Stabilisierung der QD-Fluoreszenz. Eine genaue Erklärung dieses Phänomens steht zu diesem Zeitpunkt noch aus. Favorisiert werden im Prinzip zwei verschiedene Mechanismen. Zum einen könnte die Zugabe eines effektiven Reduktionsmittels zur Reduktion von oxidierten Liganden führen, die somit wieder für eine Bindung an die QD-Oberfläche zur Verfügung stehen. Dadurch könnten zuvor entstandene QD-Aggregate verstärkt wieder in Lösung gebracht werden, was wiederum zu einer gesteigerten Fluoreszenzquantenausbeute der QD-Lösung führen würde. Zum anderen wäre auch eine direkte Interaktion des TCaEP mit der QD-Oberfläche möglich, was ebenfalls einen Einfluss auf die QD-Fluoreszenz haben könnte (siehe 4.1.1).

Um etwas genauer auf diese beiden Erklärungsansätze eingehen zu können, wurden weitere Versuche mit QD in *Standardpuffer* (50 mM Natrium-Phosphat (pH 8,5), 0,6 M Saccharose, 0,1 % LM) durchgeführt. Auf der einen Seite sollte getestet werden, ob frisch angesetztes TCaEP (dH₂O) gegenüber älterem (=oxidiertem) TCaEP, welches längere Zeit unter Luftzufuhr

gesetzt wurde, sich unterschiedlich auf die Quantum Dot-Fluoreszenz auswirkt. Zum anderen sollte die Fluoreszenz nach der Zugabe von EDTA betrachtet werden, das ähnlich wie TCaEP über mehrere Carboxylgruppen verfügt. Für die Durchführung wurden wie gehabt 15 nM QDs in *Standardpuffer* gegeben und mit 2 mM der gewünschten Substanz versetzt (frisches TCaEP, altes TCaEP oder EDTA). Anschließend wurden Emissionsspektren der Proben aufgenommen und miteinander verglichen (Abb. 3.8). Es ist kaum ein signifikanter Unterschied in der QD-Fluoreszenz nach Zugabe von frischem bzw. altem TCaEP auszumachen. In beiden Fällen kommt es gegenüber der TCaEP-freien Probe (Puffer) zu einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenz. Außerdem ist die zeitabhängige Stabilisation der QD-Emission bei beiden Proben vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Dagegen führt die Zugabe von EDTA weder zu einer so deutlichen Intensivierung des Fluoreszenzsignals noch zu dessen Stabilisierung über die Zeit. Außerdem weist das Fluoreszenzmaximum der mit TCaEP behandelten QDs im Vergleich zu den QDs in Puffer eine hypsochrome Verschiebung auf. (Die in Abb. 3.8 eingefügte schwarze Linie geht durch das Fluoreszenz-Maximum der mit TCaEP behandelten QDs).

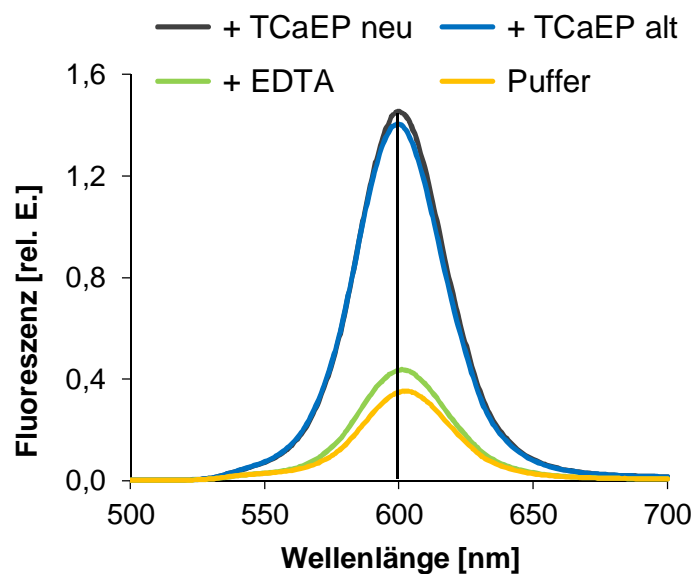


Abb. 3.8 Vergleich der QD-Fluoreszenz in Puffer und nach Zugabe von frischem TCaEP, altem TCaEP oder EDTA. Emissionsspektren von 15 nM CdSe/6xZnS/DHLA-QDs in *Standardpuffer* (Puffer) sowie in Puffer, der zusätzlich mit 2 mM frischem bzw. altem TCaEP (+ TCaEP neu/alt) oder EDTA (+ EDTA) versetzt wurde. Die Proben wurden vor der Messung 90 Minuten auf Eis inkubiert. Die schwarze Linie kennzeichnet das Fluoreszenzmaximum der mit TCaEP behandelten QDs. Anregung: 360 nm.

3.2 Stabilisierung der Typ-II QD-Fluoreszenz in wässriger Lösung

3.2.1 Typ-II QDs mit DHLA-Liganden

Im Rahmen dieser Doktorarbeit kamen auch sogenannte Typ-II Quantum Dots zum Einsatz. Im Gegensatz zu den Typ-I QDs (CdSe/6xZnS/DHLA) bestand der Kern hier aus CdTe, das von drei CdSe-Hüllen umgeben war. Ähnlich wie bei den Typ-I QDs bestand die äußerste Hülle dieser Typ-II QDs auch aus ZnS (CdTe/3xCdSe/ZnS). Um die QDs wasserlöslich zu machen, wurden die QDs ebenfalls mit einem Liganden, i.d.R. DHLA, versehen.

Die Fluoreszenz der CdTe/3xCdSe/ZnS/DHLA-QDs war nach Verdünnung in einer wässrigen Lösung (dH₂O) ähnlich instabil, wie die der bislang verwendeten Typ-I QDs. Die Zugabe von TCaEP mit *Standardpuffer* (TCaEP + Puffer) führte in der optimierten Zusammensetzung ebenfalls zu einer massiven Verstärkung der Quantenausbeute und zu einer Stabilisierung der Fluoreszenz über einen Zeitraum von 24 Stunden (Abb. 3.9). Um den stabilisierenden Einfluss von TCaEP auf QDs, die mit einer ZnS-Hülle versehen sind, auch im Zusammenhang mit der Anwesenheit von DHLA zu überprüfen, wurden mehrere Ansätze mit 15 nM der Typ-II QDs hergestellt und Fluoreszenzspektren aufgenommen. Neben den bereits erwähnten Ansätzen mit reinem Aquadest und mit *Standardpuffer* inklusive TCaEP wurden weitere wie folgt angesetzt: QDs in Aquadest mit DHLA (dH₂O + DHLA), in *Standardpuffer* (Puffer), in *Standardpuffer* mit DHLA (DHLA + Puffer) sowie in *Standardpuffer* mit TCaEP und DHLA (TCaEP + DHLA + Puffer).

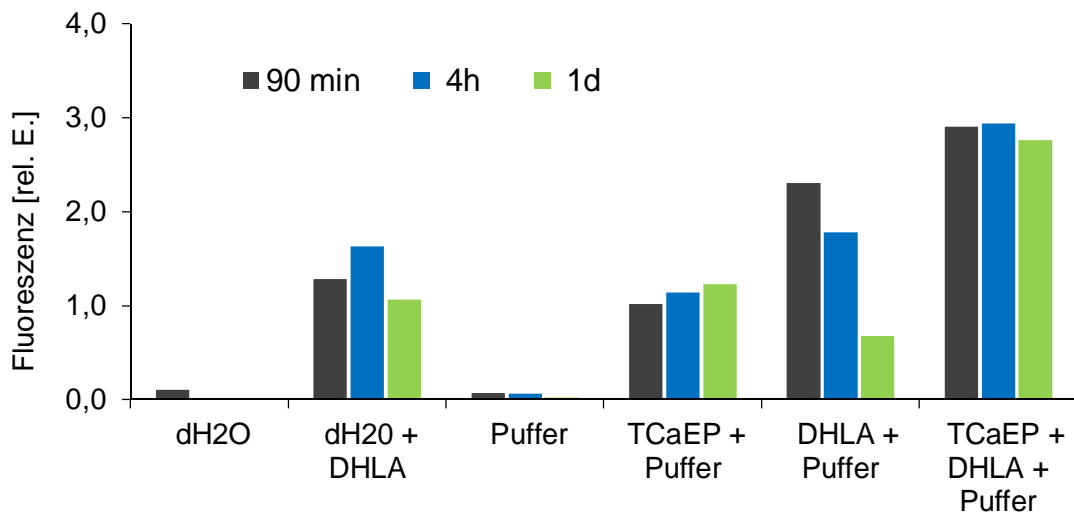


Abb. 3.9 Einfluss der Zusammensetzung einer wässrigen Umgebung auf die Fluoreszenz von Typ-II QDs mit DHLA-Liganden. Fluoreszenzmaxima von 15 nM CdTe/3xCdSe/ZnS/DHLA-QDs in Aquadest ohne (dH₂O) und mit DHLA (dH₂O + DHLA) sowie in *Standardpuffer* ohne weitere Zusätze (Puffer), mit TCaEP (TCaEP + Puffer), mit DHLA (DHLA + Puffer) und mit gleichzeitiger Zugabe von TCaEP und DHLA (TCaEP + DHLA + Puffer). Die Endkonzentration von TCaEP und DHLA betrug jeweils 2 mM. Die Proben wurden nach 90 min, vier Stunden (4h) sowie nach einem Tag (1d) vermessen. Anregung: 360 nm.

Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von Liponsäure zu QDs in Aquadest zu einer deutlich verstärkten, wenn auch über die Zeit stark variierenden Fluoreszenz führte. Wie auch bei den Typ-I QDs war die Emission der QDs in reinem *Standardpuffer* im Vergleich zu einer Probe, die zusätzlich TCaEP enthielt, deutlich schwächer und instabiler. Nach der Zugabe von DHLA zu QDs in *Standardpuffer* konnte nach 90 min eine stärkere QD Fluoreszenz vermessen werden als in einer gleichalten Probe mit Puffer und TCaEP. Die Fluoreszenz erwies sich jedoch als extrem instabil und sank im Verlaufe eines Tages noch unter den Ausgangswert des Ansatzes mit TCaEP und Puffer. Die stärkste Emission wurde jedoch in dem QD-Ansatz mit TCaEP und DHLA gemessen. Diese lag noch einmal knapp 20 % höher als in der 90 min-Probe mit Puffer

und DHLA. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenz dieser QDs über den Zeitraum von 24 Stunden nahezu unverändert war.

3.2.2 Typ-II QDs mit MPA-Liganden

Neben den CdTe/3xCdSe/ZnS/DHLA-QDs wurden die gleichen Partikel auch mit Mercaptopropionsäure (MPA) als Liganden hergestellt. Im Gegensatz zur DHLA handelt es sich bei MPA um einen sogenannten „einzähnigen“ Liganden, da dieser nur über eine SH-Gruppe verfügt und somit nur mit einer funktionalen Gruppe an die Oberfläche der QDs binden kann.

Eine Verdünnung der MPA-QDs in wässriger Lösung (15 nM) führte wie bei allen anderen verwendeten QDs zu einer deutlichen Abnahme der Fluoreszenz (Abb. 3.10). Analog zu den QDs mit DHLA (vgl. Abb. 3.9) konnte die QD-Fluoreszenz durch die Überführung in *Standardpuffer* allein nicht auf einem Niveau gehalten werden. Jedoch wurde mit der Zugabe von TCaEP (2 mM) auch die Fluoreszenz der MPA-QDs über einen Zeitraum von mindestens einem Tag stabilisiert.

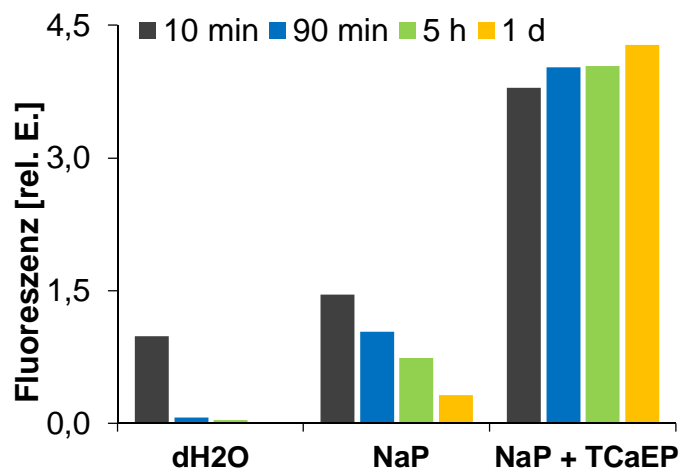


Abb. 3.10 Einfluss der Zusammensetzung einer wässrigen Umgebung auf die Fluoreszenz von Typ-II QDs mit MPA-Liganden. Fluoreszenzmaxima von 15 nM CdTe/3xCdSe/ZnS/MPA-QDs in Aquadest (dH₂O), in *Standardpuffer* ohne weitere Zusätze (Puffer) sowie in *Standardpuffer* mit 2 mM TCaEP. Die Proben wurden nach 10 min, 90 min, fünf Stunden (5h) sowie nach einem Tag (1d) vermessen. Anregung: 360 nm.

3.3 Vorarbeiten für die Herstellung von Hybrid-Konstrukten mit LHCII

3.3.1 Herstellung und Charakterisierung von LHCII-Trimeren

Für die vorliegende Arbeit wurden, auch im Rahmen von Bachelor- und Diplomarbeiten, mehrere neue LHCII-Varianten hergestellt. Dabei wurden die gewünschten Veränderungen mit Hilfe einer Mutagenese-PCR (vgl. 2.3.5) in das LHCII-Gen eingefügt, die Sequenz über Sanger-Sequenzierung (vgl. 2.3.7) überprüft und das Plasmid zur Expression des Proteins in geeignete Bakterienstämme transformiert (vgl. 2.3.6). Nach der Überexpression (vgl. 2.4.2) und Reinheitsüberprüfung der sogenannten Inclusion Bodies (IBs) über denaturierende SDS-PAGE

(vgl. 2.5.2.2) wurde das Protein über eine Detergenzwechsel-Rekonstitution gefaltet (vgl. 2.4.3) und anschließend eine Trimerisierung über Affinitätschromatographie (LHCII-Varianten mit His₆-Tag) (vgl. 2.4.4) oder in Liposomen (LHCII-Varianten ohne His₆-Tag) (vgl. 2.4.5) durchgeführt. Nach der Aufreinigung über einen Saccharosegradienten durch Ultrazentrifugation konnten die LHCII-Trimere entnommen werden (vgl. 2.4.6) und spektroskopisch auf ihre korrekte Faltung bzw. ihren Oligomerisierungsgrad überprüft werden (vgl. 2.6.2.1 und 2.6.3).

Im Folgenden soll exemplarisch am Beispiel der Variante $\Delta N11h$ die Herstellung und Charakterisierung von LHCII-Komplexen vorgestellt werden. Nachdem das Plasmid mit der genetischen Information für die LHCII-Variante $\Delta N11h$ durch eine Sequenzierung auf eine korrekte Basenabfolge überprüft und schließlich in einen expressionsfähigen Bakterienstamm (hier: Rosetta, vgl. 2.2.3) transformiert wurde, erfolgte eine Totalproteinanalyse. Nach SDS-PAGE des bakteriellen Totalproteinansatz konnte auf Höhe von ca. 24 kDA eine Protein-Bande visualisiert werden, deren Aufreinigung ebenfalls über die Gelelektrophorese bestätigt wurde (Abb. 3.11 A). Diese IBs wurden einer Detergenzwechselrekonstitution sowie Trimerisierung über eine Nickelsäule unterzogen und das LHCII-Pigment-Gemisch mittels Ultrazentrifugation aufgetrennt (Abb. 3.11 B). Auf diesem Weg konnten LHCII-Trimere getrennt von Monomeren und freiem Pigment entnommen und zur weiteren Analyse spektroskopisch vermessen werden.

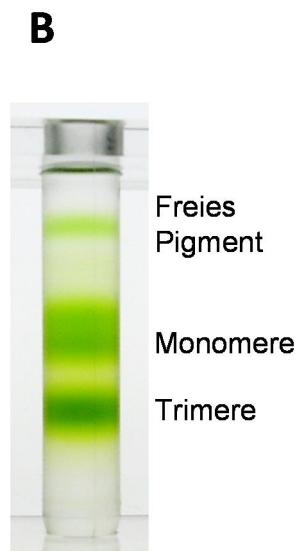
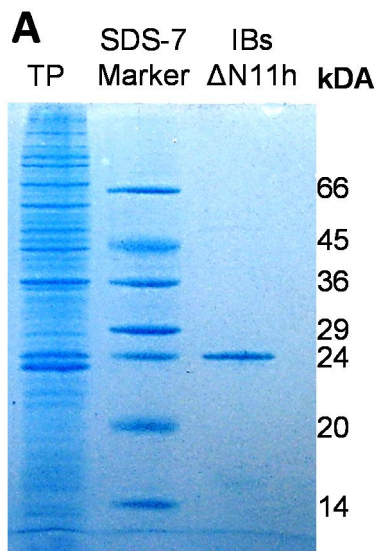


Abb. 3.11 Herstellung von LHCII-Komplexen exemplarisch gezeigt am Beispiel von $\Delta N11h$. A: SDS-PAGE des Totalproteinansatzes (TP) einer Bakterienkultur, die ein Plasmid zur Überexpression von $\Delta N11h$ enthält, und von aufgereinigten IBs (IBs $\Delta N11h$). B: Saccharosegradientenröhrchen mit $\Delta N11h$ -Komplexen nach Ultrazentrifugation.

Das CD-Spektrum der als $\Delta N11h$ -Trimere deklarierten Bande (Abb. 3.11 B) zeigte vier für LHCII-Trimere typische negative Signale bei 473, 492, 650 und 680 nm (Abb. 3.12 A). Nach Anregung des Chl *b* bei 470 nm zeigte sich im Emissionsspektrum nur eine Chl *a*-Fluoreszenz, so dass von einem vollständigen Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a* und somit einer korrekten Faltung der Trimere ausgegangen werden konnte (Abb. 3.12 B). Über die Aufnahme eines Absorptionsspektrums konnte abschließend die Konzentration der Komplexe bestimmt werden (Abb. 3.12 C).

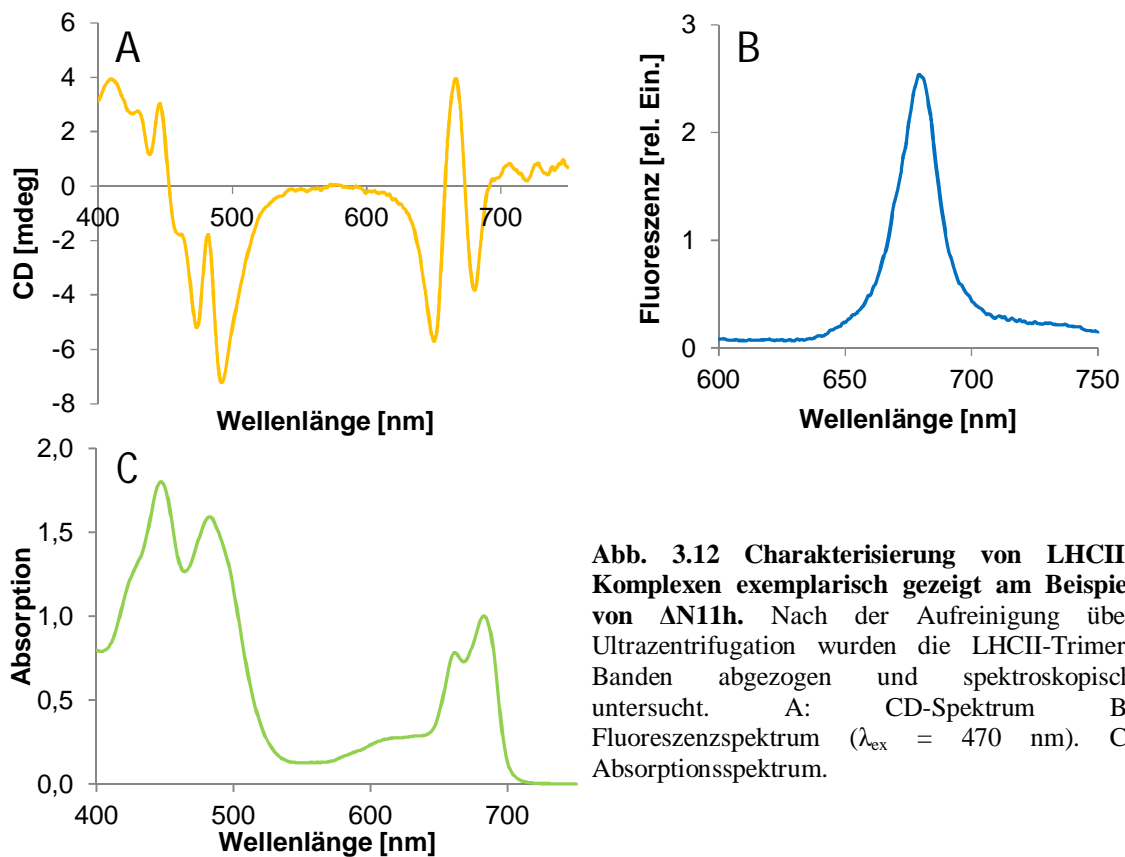


Abb. 3.12 Charakterisierung von LHCII-Komplexen exemplarisch gezeigt am Beispiel von $\Delta N11h$. Nach der Aufreinigung über Ultrazentrifugation wurden die LHCII-Trimer-Banden abgezogen und spektroskopisch untersucht. A: CD-Spektrum B: Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$). C: Absorptionsspektrum.

So aufbereitete LHCII-Trimere konnten, wenn dunkel und kühl gelagert, mehrere Wochen aufbewahrt werden. Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten LHCII-Varianten sowie Informationen zu Hersteller und zur Herstellungs-Strategie kann der Tabelle 2.1 entnommen werden.

3.3.2 Wiederaufbereitung von aggregierten QDs

Die in dieser Arbeit verwendeten QDs wurden ausschließlich von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Thomas Basché am Institut für Physikalische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz hergestellt. Um den QDs Wasserlöslichkeit zu verleihen, wurden sie mit Liganden wie Dihydroliponsäure (DHLLA) versehen. Bei längerer Lagerung kam es zur Oxidation dieser Liganden und somit zu einer schrittweisen Aggregation der QDs. Damit die aufwendig hergestellten QD-Proben an dieser Stelle nicht verworfen werden mussten, wurde an einem Wiederaufbereitungsverfahren gearbeitet, bei dem die QDs möglichst vollständig wieder in Lösung gebracht werden konnten. So sollte gewährleistet werden, dass die Qualität der QDs nicht durch zurückbleibende Aggregate beeinflusst wurde und eine Abschätzung der QD-Konzentration auch nach der Aufbereitung der Proben möglich war.

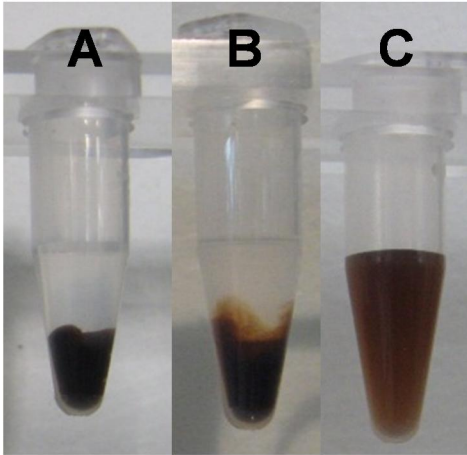


Abb. 3.13 Wiederaufbereitung von aggregierten QDs. QD-Aliquot nach 4 min Zentrifugation bei 14.000 Upm (A), nach Austausch des wässrigen Überstands und Zugabe von frischer DHLA (B) sowie nach Ultraschallbadbehandlung und erneuter 4 min Zentrifugation bei 14.000 Upm (C).

Nach einigen Tests mit aggregierten QDs erwies es sich am sinnvollsten, einen Zeitpunkt abzuwarten, bei dem die QDs vollständig abzentrifugiert werden konnten. Dies konnte nach den ersten sichtbaren Aggregaten einige Tage bis wenige Wochen dauern. In der Regel wurden nach Resuspension der (aggregierten) QD-Stammlösung 500-750 μ l Aliquots entnommen und in einer Tischzentrifuge bei 19.060 g 4 min abzentrifugiert, so dass der Überstand vollkommen klar war (Abb. 3.13 A). Anschließend wurde der Überstand abgenommen und frische DHLA in einem Verhältnis von 1000 zu 1 pro QDs dazugegeben. Dann wurde die Lösung mit dH_2O auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt (Abb. 3.13 B) und wenige Sekunden im Ultraschallbad behandelt, um die QD-Aggregate vollständig zu lösen. Mit NaOH (ca. 4 μ l 1 M NaOH bei 750 μ l Ansatz) wurde anschließend die Lösung auf einen pH zwischen 8 und 10 eingestellt. Die Überprüfung des pH erfolgte aufgrund der geringen Probenvolumina mittels pH-Streifen. Die Qualität der QDs wurde für ausreichend befunden, wenn keine Trübung der Lösung zu erkennen war und nach einer 4 minütigen Zentrifugation bei 19.060 g sich kein QD-Pellet mehr bildete (Abb. 3.13 C).

Diese Form der Aufbereitung wurde in der vorliegenden Arbeit nur für die CdTe/3xCdSe/ZnS-QDs durchgeführt. Es gibt jedoch keinen ersichtlichen Grund, eine solche Wiederaufbereitung nicht auch auf andere wasserlösliche QDs anzuwenden.

3.4 Hybridkomplexe aus LHCII und Typ-I QD

3.4.1 Energietransfer zwischen Typ-I QDs und LHCII in *Standardpuffer*

Mit der Entwicklung eines auf die QD-Emission stabilisierend wirkenden Puffers eröffnete sich nun die Möglichkeit, gezielt einen Energietransfer innerhalb von Hybridkomplexen aus LHCII und Quantum Dots zu untersuchen. Dies wurde zwar auch schon in anderen Arbeiten versucht (z.B. Eck, 2009), aber bislang stellte sich die Schwierigkeit, dass das Donorverhalten, also die QD-Emission, sehr unzuverlässig war. Denn nur wenn die Stabilität und somit die Vergleichbarkeit der Emissionsspektren eines zu betrachtenden Donors bei verschiedenen Proben gewährleistet ist, kann man das Fluoreszenzverhalten des Donors als Maß für Energietransfer heranziehen. Auch das Verhalten des Akzeptors in einem solchen System reicht alleine als Maß nicht aus, um Energietransfer zu qualifizieren bzw. zu quantifizieren. Diese

Hürde schien mit dem Einsatz des *Standardpuffers* aus 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer, 0,1 % LM und 0,6 M Saccharose in Kombination mit 2 mM TCaEP genommen zu sein.

Daher sollte für eine erste Energietransfer-Betrachtung überprüft werden, ob eine Löschung der Donorfluoreszenz in Abhängigkeit eines LHCII/QD-Verhältnisses eintritt. Dafür wurden zunächst einmal die bisher verwendeten Typ-I QDs (CdSe/6xZnS/DHLA) verwendet, die auch schon für die Untersuchungen der Fluoreszenzstabilität eingesetzt wurden. Aufgrund ihrer spektroskopischen Eigenschaften, sie besitzen im grünen Wellenlängenbereich ihr Fluoreszenzmaximum, sollten sie in einem Hybridkomplex mit LHCII als Energiedonor fungieren.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit LHCII-Trimeren gearbeitet, da diese wesentlich stabiler sind als LHCII-Monomere. Mit der Bezeichnung LHCII sind daher immer LHCII-Trimere gemeint. Die Konzentrationsangaben für den LHCII beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf die Monomere. Zunächst einmal wurde als LHCII-Variante der C3.2h ausgewählt, der in seiner AS-Sequenz mit dem nativen LHCII übereinstimmt und darüber hinaus mit einem His₆-Tag versehen ist, wodurch eine schnelle Herstellung von Trimeren über die Nickelsäule ermöglicht wird. Für die Messungen wurden mehrere Proben mit einer konstanten Menge an QDs (15 nM) und einer variierenden Menge an LHCII-Trimeren hergestellt. In der Regel wurden dabei LHCII (Trimer)/QD-Verhältnisse von 0,25, 0,5, 1, 2 und 3 gewählt, in Einzelfällen auch von 5 und 7,5. Die Proben wurden in *Standardpuffer* zusammen mit 2 mM TCaEP in den gewünschten Verhältnissen zusammengegeben und für 90 min auf Eis inkubiert. Die entsprechenden LHCII bzw. QD-Referenzen wurden äquivalent angesetzt und ebenfalls für 90 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden von allen Proben Fluoreszenz- und Absorptionsspektren aufgenommen und miteinander verglichen (Abb. 3.14).

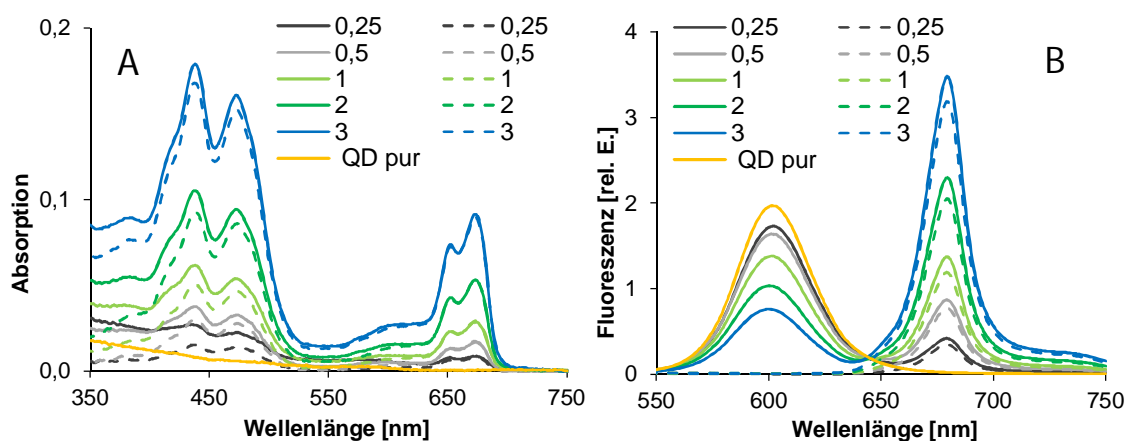


Abb. 3.14 Energietransferbetrachtungen zwischen Typ-I QDs (CdSe/6xZnS/DHLA) und LHCII-Trimeren (C3.2h). Spektren der QD/LHCII-Komplexe (durchgezogen) mit ihren entsprechenden LHCII-Referenzen (gestrichelt). Außerdem wurde das Spektrum einer entsprechenden QD-Lösung ohne LHCII aufgenommen (gelb). Es wurden LHCII (Trimer)/QD-Verhältnisse von 0,25, 0,5, 1, 2 und 3 gewählt. QD-Konzentration: 15 nM. A: Absorptionsspektren. B: Emissionsspektren, Anregung: 360 nm.

Das Absorptionsspektrum der reinen QD-Lösung zeigte keine Absorption im Bereich von 670 nm (Abb. 3.14 A). Dies erlaubte einen direkten Vergleich der LHCII-Konzentration in den einzelnen QD/LHCII-Mischproben mit der entsprechenden LHCII-Referenz. Aufgrund der Deckungsgleichheit der Absorptionsspektren von Proben und entsprechenden Referenzen im Bereich von 670 nm konnte dann von übereinstimmenden LHCII-Konzentrationen ausgegangen werden.

Die aufgenommenen Emissionsspektren der QD/LHCII-Hybridkomplexe zeigten, dass mit Zunahme des LHCII-QD-Verhältnisses die Fluoreszenz der QDs abnahm (Abb. 3.14 B). Da sich die Spektren von LHCII und QD überschneiden, musste für eine genauere Betrachtung des Donor- bzw. Akzeptorverhalten eine Dekonvolution der Spektren vorgenommen werden. Nach der Zerlegung der Originalspektren in ihre zwei Einzelspektren konnten das Verhalten des Donors und des Akzeptors dann gesondert betrachtet und ausgewertet werden (Abb. 3.15).

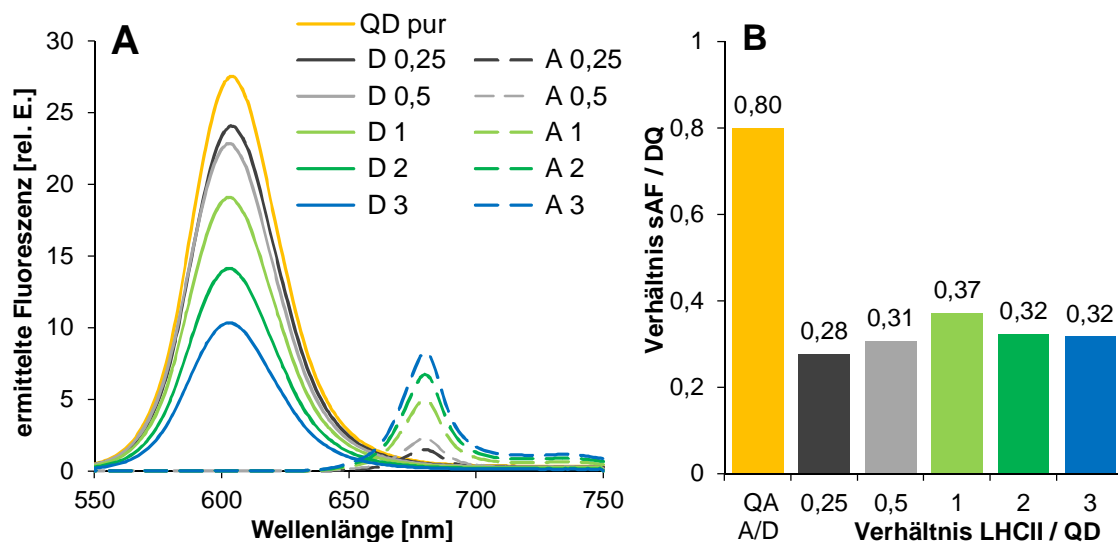


Abb. 3.15 Betrachtungen des Fluoreszenzverhaltens von Donor und Akzeptor bei verschiedenen LHCII/QD-Verhältnissen. A: Donorfluoreszenz (D, durchgezogene Linien) und sensibilisierter Fluoreszenzzuwachs des Akzeptors (A, gestrichelte Linien) bei LHCII/QD-Verhältnissen von 0 (= QD pur, gelb), 0,25, 0,5, 1, 2 und 3. Die Daten wurden durch Dekonvolution der Emissionsspektren aus Abb. 3.14 B gewonnen. B: Verhältnis der Flächen von sensibilisierter Akzeptorfluoreszenz (sAF) und gelöschter Donorfluoreszenz (DQ) bei den LHCII (Trimer)/QD-Verhältnissen von 0,25, 0,5, 1, 2 und 3. Ebenfalls dargestellt ist das Verhältnis der Quantenausbeuten von LHCII und QD (QA A/D, gelb). QD-Konzentration: 15 nM.

Zunächst einmal fiel auf, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Abnahme der Donorfluoreszenz (Abb. 3.15 A, durchgezogene Linien) und der sensibilisierten Akzeptorfluoreszenz (entspricht dem Flächenzuwachs an Fluoreszenz gegenüber der entsprechenden LHCII-Referenz) hergestellt werden konnte (Abb. 3.15 A, gestrichelte Linien). Je höher der Überschuss an LHCII gegenüber den QDs, desto stärker wurde die QD-Fluoreszenz gelöscht und desto größer war der Fluoreszenzzuwachs des LHCII. Das Verhältnis der Flächen von gelöschter Donorfluoreszenz und sensibilisierter Akzeptorfluoreszenz lag für alle LHCII/QD-Verhältnisse zwischen 0,28 und 0,37 (Abb. 3.15 B). Das Verhältnis der

Quantenausbeuten (QA) von LHCII und QD lag gerundet bei 0,8, wobei für den LHCII eine QA von 21 % und für den QD von 25 % zugrunde gelegt wurde. Wenn die Energie, die beim Donor verschwindet, im Rahmen eines Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) vollständig beim Akzeptor wieder auftaucht, sollten die beiden oben beschriebenen Verhältnisse gleich sein (siehe 4.2.1).

Um weitere Hinweise auf einen möglichen Energietransfer zwischen den Typ-I QDs und LHCII-Trimeren zu erhalten, wurden zusätzlich Anregungsspektren der Hybridkomplexe und der entsprechenden Referenzen aufgenommen. Dabei wurden die Proben jeweils von 360 bis 670 nm angeregt und die LHCII-Emission bei 680 nm detektiert (Abb. 3.16). Wie zu erwarten ähnelt das Anregungsspektrum der LHCII-QD-Hybridkomplexe dem Absorptionsspektrum einer LHCII-Probe. Erst im direkten Vergleich mit dem Anregungsspektrum von freiem LHCII zeigt sich in Hybridkomplexen eine Zunahme der Emission nach Anregung im Bereich zwischen 360 und 450 nm. Die Emission nimmt mit zunehmender Anregungsenergie (also mit abnehmender Wellenlänge) zu. Die Differenz dieser beiden Spektren deckt sich in weiten Teilen mit dem angepassten Absorptionsspektrum der QDs.

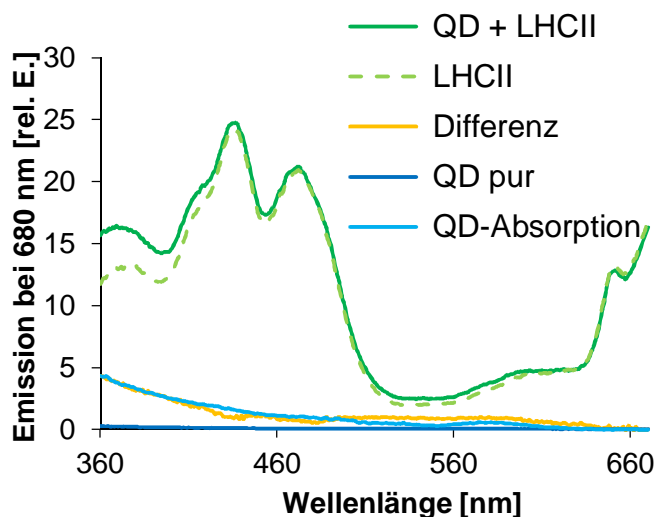


Abb. 3.16 Anregungsspektren von Hybridkomplexen aus Typ-I QDs und LHCII. Anregungsspektren von QD-LHCII-Hybridkomplexen (dunkelgrün), der LHCII- (hellgrün gestrichelt) und der QD-Referenz (dunkelblau) bei einer Emission von 680 nm. Zur Veranschaulichung dient das Differenzspektrum (orange) von Hybridkomplexen und freiem LHCII im Vergleich mit dem angepassten Absorptionsspektrum der reinen QDs (hellblau). QD/LHCII (Trimer)-Verhältnis = 1, QD-Konzentration: 15 nM.

Neben den Anregungsspektren sollte auch die zeitaufgelöste Betrachtung der Fluoreszenzen von Donor und Akzeptor weitere Informationen über einem möglichen Energietransfer zwischen Typ-I QDs und LHCII-Trimeren liefern. Hierfür wurden ebenfalls 15 nM QDs in *Standardpuffer* und 2 mM TCaEP mit LHCII-Trimeren (C3.2h) im Verhältnis 1 zu 1 angesetzt. Außerdem wurden entsprechende LHCII- bzw. QD-Referenzen hergestellt. Die Proben wurden wie gewohnt auf Eis inkubiert und die Fluoreszenzmaxima der zu betrachtenden Komponente zeitaufgelöst vermessen (die Messungen wurden von Dr. Mathias Haese der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Basché am Institut für Physikalische Chemie durchgeführt). Dabei soll die Analyse der sogenannten Abklingzeit (*decay time*) der Donorfluoreszenz sowie die zeitaufgelöste Betrachtung der Akzeptorfluoreszenz spezifische Informationen zum Energietransfer liefern. Aufgrund der dortigen Messapparatur war es hierbei nicht möglich, die

Proben während der Messungen wie gewohnt bei 360 nm anzuregen. Die Proben wurden bei 560 nm angeregt, da hier die (störende) LHCII-Absorption relativ gering ist. Für eine erste Betrachtung des Energietransfers wurden von den Proben Emissionsspektren von 570 bis 750 nm nach der Anregung bei 560 nm aufgenommen (Abb. 3.17). Wie auch schon nach einer Anregung mit 360 nm (vgl. Abb. 3.14 + Abb. 3.15) zeigte sich bei dem Spektrum der Hybridkomplexe gegenüber der QD-Referenz eine deutliche Abnahme der QD-Fluoreszenz. Auf Seiten des LHCII konnte vergleichsweise nur eine sehr geringe sensibilisierte Akzeptorfluoreszenz verzeichnet werden.

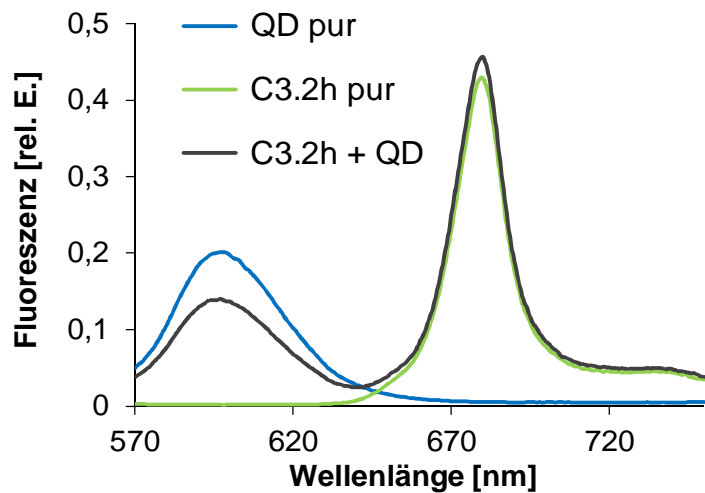


Abb. 3.17 Emissionsspektren von Typ-I QDs und LHCII-Trimeren (C3.2h) nach Anregung bei 560 nm. Emissionsspektrum der QD/LHCII-Komplexe (grau), der entsprechenden LHCII-Referenz (grün) und das Spektrum einer entsprechenden QD-Lösung ohne LHCII (blau). QD/LHCII (Trimer)-Verhältnis = 1, QD-Konzentration: 15 nM. Anregung: 560 nm.

Im Rahmen der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen wurde beobachtet, dass die Fluoreszenz von QDs in Hybridkomplexen mit LHCII im Vergleich zur Fluoreszenz von reinen QDs eine kürzere Abklingzeit aufwies (Abb. 3.18 A). Die Fluoreszenzlebensdauern von reinem LHCII und LHCII in Hybridkomplexen waren vergleichsweise ähnlich, wobei die Abklingzeit des freien LHCII minimal kürzer war (Abb. 3.18 B).

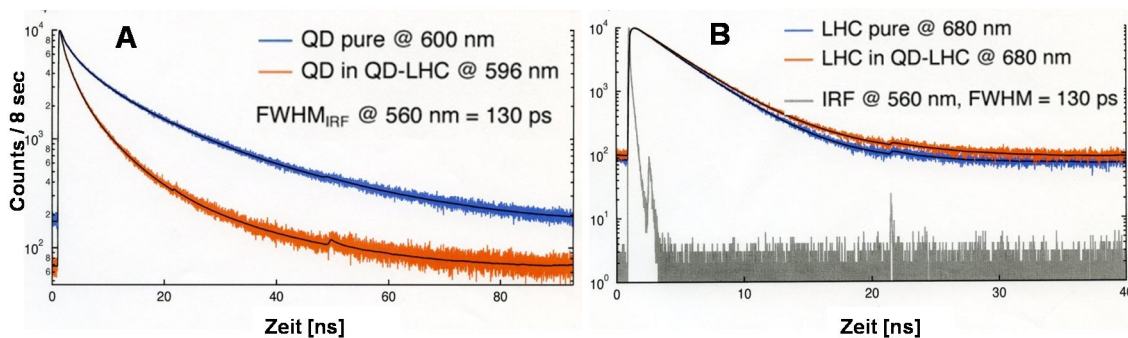


Abb. 3.18 Fluoreszenzabklingzeiten der LHCII-QD-Hybridkomplexe und der Einzelkomponenten LHCII und QD. Fluoreszenzabklingzeiten A: von QDs in QD-LHCII-Hybridkomplexen (rot) bzw. freien QDs (blau) und B: von LHCII in Hybridkomplexen (rot) bzw. reinem LHCII (blau). Betrachtet wurden die Fluoreszenzmaxima der jeweiligen Komponente über einen Zeitraum von mehreren Nanosekunden. Anregung: 560 nm, Emission_{LHCII}: 680 nm, Emission_{QD}: 600 nm (rein) bzw. 596 nm (Hybridkomplex). Die Abbildungen wurden von Dr. Mathias Haase zur Verfügung gestellt.

Ausgehend von den zeitaufgelösten Fluoreszenzabklingzeiten der Einzelkomponenten (LHCII bzw. QD) bzw. dieser Komponenten in den Hybridkomplexen wurden die Abklingzeiten (τ) und die dazugehörigen Amplituden (A) ermittelt (Tabelle 3.1). Aus diesen Werten konnte dann für jede Komponente die durchschnittliche Abklingzeit berechnet werden. Die Abklingzeit von QDs verkürzte sich in Hybridkomplexen von durchschnittlich 6,8 ns auf 2,9 ns. Die durchschnittlichen Abklingzeiten von LHCII beliefen sich dabei auf 3,0 ns in freiem Zustand und auf 2.9 ns in Hybridkomplexen mit QDs.

Tabelle 3.1 Halbwertzeiten (τ) und Amplituden (A) der Fluoreszenzsignale von freiem QD und LHCII bzw. in Hybridkomplexen. (Daten wurden von Dr. Mathias Haase zur Verfügung gestellt.)

	A_1	τ_{1} (ns)	A_2	τ_{2} (ns)	A_3	τ_{3} (ns)	A_4	τ_{4} (ns)
QD (pur)	0,30	0,379	0,25	2,4	0,28	8,1	0,17	22,4
QD (Hybrid)	0,35	0,334	0,37	1,7	0,23	5,4	0,05	17,3
LHCII (pur)	0,70	2,6	0,30	4,0	-	-	-	-
LHCII (Hybrid)	0,83	3,0	0,06	6,8	-0,11	0,062	-	-

3.4.2 Energietransfer zwischen Typ-I QDs und LHCII in Tris/HCl-Puffer

Nachdem sich gezeigt hat, dass die QD-Fluoreszenz in Tris/HCl-Puffer nach wenigen Tagen vollständig gelöscht wird (vgl. 0), sollte überprüft werden, ob sich die Emissionsspektren von Hybridkomplexen aus LHCII und Typ-I QDs in Tris/HCl-Puffer von entsprechenden Spektren in NaP-Puffer unterscheiden. Hierfür wurden die Fluoreszenzmessungen in Puffer durchgeführt, der dem *Standardpuffer* entsprach, bis auf die Verwendung von 50 mM Tris/HCl statt 50 mM Natrium-Phosphat (beides pH 8,5). Analog zu 3.4.1 wurden 15 nM QDs mit 15 nM LHCII-Trimeren (C3.2h) zusammengegeben und vermessen. Der Vergleich der Emissionsspektren der Einzelkomponenten mit dem Spektrum der Hybridkomplexe zeigt, dass es bei dieser Pufferzusammensetzung weder zu einer Löschung der QD-Fluoreszenz noch zu einer sensibilisierten Akzeptorfluoreszenz auf Seiten des LHCII kam (Abb. 3.19). Die zugehörigen Absorptionsspektren bestätigten, dass sich die LHCII- bzw. QD-Konzentrationen in den Hybridkomplexen mit den Konzentrationen der entsprechenden Referenzen deckten (Daten nicht gezeigt).

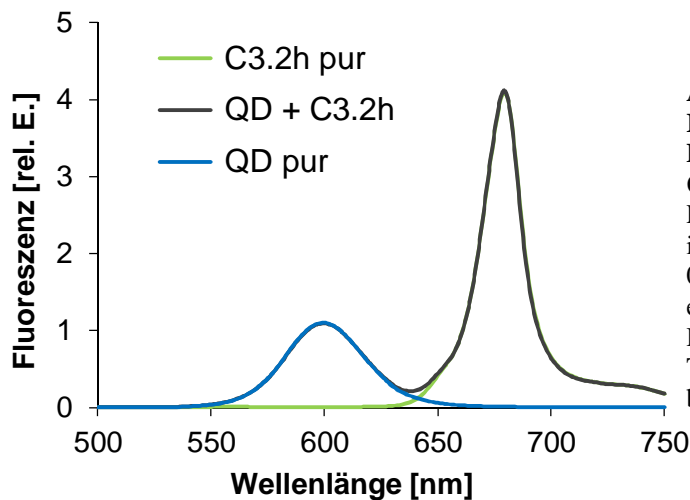


Abb. 3.19 Emissionsspektren von Typ-I QDs und LHCII (C3.2h) in Tris/HCl-Puffer. Emissionsspektren der QD/LHCII-Komplexe (grau), des reinen LHCII (grün) und der reinen QDs (blau) in einem Puffer aus 50 mM Tris/HCl, 0,1 % LM und 0,6 M Saccharose nach einer 90 minütigen Inkubation auf Eis. Das Verhältnis von QD zu LHCII-Trimeren ist 1, die QD-Konzentration beträgt 15 nM. Anregung: 470 nm.

3.4.3 Energietransfer zwischen Typ-I QDs und verschiedenen LHCII-Varianten im Vergleich

Alle bisherigen Messungen zur Untersuchung des Energietransfers zwischen Typ-I QDs (CdSe/6xZnS/DHLA) und LHCII wurden mit Trimeren der Variante C3.2h durchgeführt. Es wurde bereits gezeigt, dass der LHCII sowohl über diesen His₆-Tag als auch über den positiv geladenen N-Terminus mit den QDs interagiert (Erker, 2010). Somit kann der C3.2h mit den QDs theoretisch gleichzeitig sowohl über den N-Terminus (positive Ladungen) wie auch über den C-Terminus (His₆-Tag) mit den QDs wechselwirken. Mithilfe von Fluoreszenzmessungen an LHCII-QD-Hybridkomplexen mit verschiedenen LHCII-Varianten sollen nun genauere Informationen über die Art der Interaktion zwischen den QDs und dem LHCII gewonnen werden. Dabei kamen der D7f3, der dem wildtypischen LHCII entspricht, und der A7N bzw. Z8N zum Einsatz. Die beiden Letzteren verfügen jeweils über eine zusätzliche Peptidsequenz am N-Terminus, mit der sie theoretisch an die ZnS-Oberfläche der QDs binden können (Gundlach, 2010).

Um die verschiedenen LHCII-Varianten miteinander zu vergleichen, wurden jeweils 15 nM QDs in *Standardpuffer* und 2 mM TCaEP mit den verschiedenen LHCII zu unterschiedlichen LHCII-QD-Verhältnissen (0,5, 1, 2, 5 und 7,5) vermischt, 90 min auf Eis inkubiert und fluoreszenzspektroskopisch vermessen. (Es wurden keine Proben mit dem A7N in einem LHCII-QD-Verhältnis von 7,5 hergestellt.) Als Maßstab für den Energietransfer und somit für einen Vergleich zwischen den verschiedenen LHCII-Variante wurde die Abnahme der QD-Fluoreszenz herangezogen. Hierfür wurden die Emissionsspektren der verschiedenen Hybridkomplexe einer Dekonvolution unterzogen und die Maxima der anteiligen QD-Einzelspektren ermittelt. Die Fluoreszenz von reinen QD wurde als 100 % definiert und die ermittelten QD-Fluoreszenzen aus den Hybridkomplexen dazu in Bezug gesetzt (Abb. 3.20).

Mit Hilfe von Absorptionsspektren wurden die Konzentrationen in den Hybridkomplexen und den entsprechenden Referenzen überprüft (Daten nicht gezeigt).

Für alle LHCII-Varianten gilt, dass je höher das LHCII-QD-Verhältnis ist, desto stärker wird die QD-Fluoreszenz gelöscht. Dabei lässt sich zwischen den Varianten eine Tendenz erkennen, wobei der Z8N die QD-Emission am stärksten löscht, gefolgt vom A7N, D7f3 und schließlich dem C3.2h. Jedoch sind diese Unterschiede für gleiche LHCII-QD-Verhältnisse zwischen den verschiedenen LHCII-Varianten relativ gering. So liegt die QD-Fluoreszenz bei einem LHCII-QD-Verhältnis von 5 für alle Varianten zwischen 25 und 19 %. Die Erhöhung des LHCII-QD-Verhältnis von 5 auf 7,5 führt nur noch zu einer geringfügigen Verstärkung der QD-Fluoreszenzlöschung.

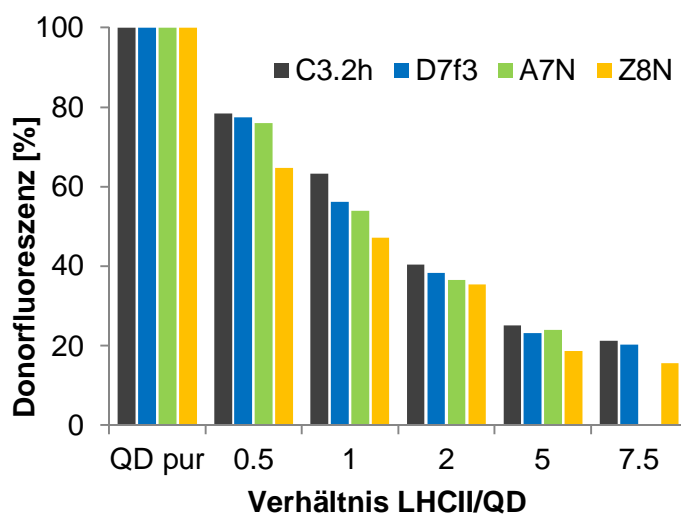


Abb. 3.20 Betrachtung der Typ-I QD-Fluoreszenz in Hybridkomplexen mit verschiedenen LHCII-Varianten. Prozentuale QD-Emissionen in reinen QD-Proben (QD pur) bzw. in Hybridkomplexen aus QDs und verschiedenen LHCII-Varianten (C3.2h, D7f3, A7N, Z8N) bei LHCII (Trimer)-QD-Verhältnissen von 0,5, 1, 2, 5 und 7,5. Weitere Details siehe Text. OD-Konzentration: 15 nM.

Alle in diesem Versuchsansatz verwendeten LHCII-Varianten verfügen über den nativen N-Terminus inklusive seiner positiven Ladungen, mit dem sie theoretisch an die negativ geladenen Carboxylgruppen der DHLA-Liganden an die QDs binden können. Darüber hinaus besitzen die Varianten A7N, Z8N und C3.2h jeweils eine zusätzliche Aminosäuresequenz, über die sie mit der ZnS-Oberfläche der QDs interagieren können. Aus diesem Grund sollte zur Kontrolle eine LHCII-Variante untersucht werden, die weder über einen positiv geladenen N-Terminus noch über eine ZnS-Bindesequenz verfügt. Dem Δ N11 fehlen 11 Aminosäuren am N-Terminus im Vergleich zum nativen LHCII und somit verfügt dieser (theoretisch) über keine Sequenz, mit der er an die QDs binden kann.

Die Überprüfung der Theorie erfolgte, indem die Proben mit $\Delta N11$ analog zum bereits untersuchten Klon C3.2h angesetzt (vgl. 3.4.1) und Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektren aufgenommen wurden (Abb. 3.21). Anhand der Absorptionsspektren konnte davon ausgegangen werden, dass sich die LCHII-Konzentrationen in den Hybridkomplexen und den entsprechenden Referenzen deckten (Abb. 3.21 A). Bei Betrachtung der Emissionsspektren konnte bei keinem der gewählten LCHII-QD-Verhältnisse eine Löschung der QD-Fluoreszenz oder eine sensibilisierte Akzeptorfluoreszenz ausgemacht werden (Abb. 3.21 B).

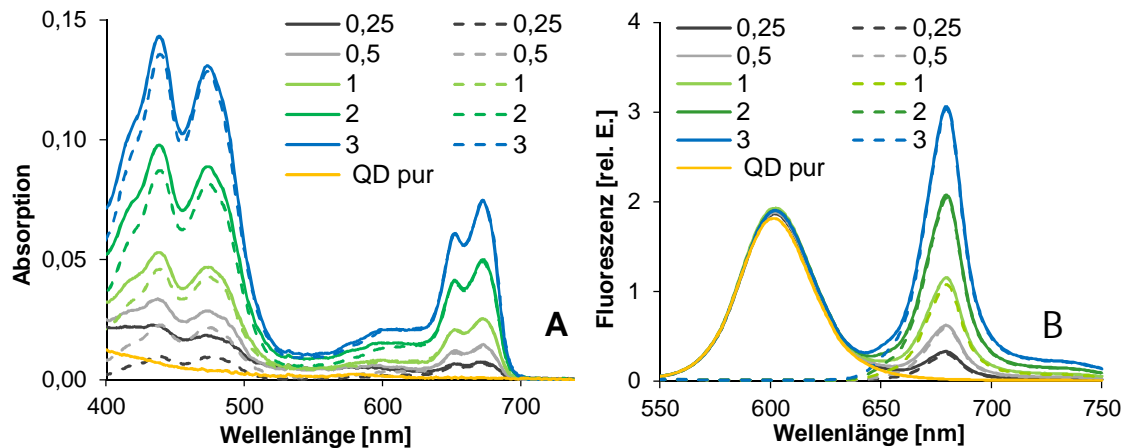


Abb. 3.21 Energietransferbetrachtungen zwischen Typ-I QDs und LHCII-Trimeren ohne QD-Bindesequenzen ($\Delta N11$). Spektren der QD/LHCII-Komplexe (durchgezogen) mit ihren entsprechenden LHCII-Referenzen (gestrichelt). Außerdem wurde das Spektrum einer entsprechenden QD-Lösung ohne LHCII aufgenommen (gelb). Es wurden LHCII (Trimer)/QD-Verhältnisse von 0,25, 0,5, 1, 2 und 3 gewählt. QD-Konzentration: 15 nM. A: Absorptionsspektren. B: Emissionsspektren, Anregung: 360 nm.

3.4.4 Bestimmung des zu erwartenden Energietransfers zwischen Typ-I QDs und LHCII

Kristina Gundlach hat im Rahmen ihrer Doktorarbeit den Försterradius von CdSe/6xZnS/DHLA-QDs und LHCII (genauer gesagt: Chl *a*) bestimmt. Dabei ist sie von einer Quantenausbeute (QA) der QDs mit 20 % ausgegangen, was sich durchaus mit der QA der in dieser Arbeit verwendeten QDs deckt (QAs der verwendeten QDs lagen zwischen 20-25%). Nach ihren Berechnungen ergab sich ein Försterradius von 41,3 Å (Gundlach, 2010).

Mithilfe des Försterradius (R_0) und des Abstands (r) zwischen dem LHCII und den QDs lässt sich ein theoretisch zu erwartender Energietransfer (ET_{Soll}) zwischen den beiden Komponenten nach folgender Formel berechnen:

$$ET_{\text{Soll}} [\%] = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) * 100$$

Der Abstand zwischen QD und LHCII hängt natürlich von der Lokalisierung der Bindesequenz am LHCII sowie von der Beteiligung der einzelnen Pigmente am Energietransfer

zwischen QDs und LHCII ab. Daher wurde zunächst einmal der Abstand zwischen QDs und LHCII bei einer Bindung über die positiven Ladungen am N-Terminus näherungsweise abgeschätzt. Zum Radius der QDs von 3,5 nm wurde daher ein zusätzlicher Abstand durch die DHLA mit 1 nm angenommen (Boggasch, 2006). Außerdem wurde die Distanz zwischen der N-terminalen Domäne des LHCII bis zum nächsten Chlorophyll über das Programm Chimera mit ca. 1,6 nm bestimmt (z.B. Abstand Chl4 zu Prolin 55 (Standfuss, 2005)). Dies entspräche einem Gesamtradius r von 6,1 nm. Mit dieser Näherung wurde über die oben beschriebene Formel ein erwarteter Energietransfer von ca. 9 % berechnet.

3.5 Hybridkomplexe aus LHCII und Typ-II QDs

Neben den Typ-I QDs wurden auch sogenannte Typ-II QDs in Hybridkomplexen mit LHCII eingesetzt. Diese Halbleiternanokristalle besitzen einen Kern aus CdTe, umhüllt von drei Schichten aus CdSe, und abschließend eine einschichtige Hülle aus ZnS (CdTe/3xCdSe/ZnS). Wie auch die Typ-I QDs wurden diese Partikel ausschließlich in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Basché am Institut für Physikalische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz hergestellt. Der Durchmesser dieser QDs beträgt im Durchschnitt 6,2 nm und sie besitzen ihr Fluoreszenzmaximum bei ca. 750 nm. Durch die Variation der ZnS-Hülle (mündliche Mitteilung Xiangxing Xu) konnten auch Nanopartikel hergestellt werden, deren Fluoreszenzmaxima weiter in den Infrarotbereich verschoben waren. Im Folgenden kamen z.B. QDs mit zwei ZnS-Schichten und einem Fluoreszenzmaximum bei ca. 820 nm zum Einsatz (vgl. 3.6) Aufgrund ihrer spektroskopischen Eigenschaften sollten diese QDs in Hybridkomplexen mit LHCII sich besonders als Energieakzeptoren eignen.

3.5.1 FRET zwischen LHCII und Typ-II QDs. Publikation I: Bio Serves Nano: Biological Light-Harvesting Complex as Energy Donor for Semiconductor Quantum Dots, Langmuir 2012, 28, 5810-5818

Bio Serves Nano: Biological Light-Harvesting Complex as Energy Donor for Semiconductor Quantum Dots

Mara Werwie,[†] Xiangxing Xu,[‡] Mathias Haase,[§] Thomas Basché,[§] and Harald Paulsen*,[†]

[†]Institut für Allgemeine Botanik, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Johannes-von-Müllerweg 6, 55099 Mainz, Germany

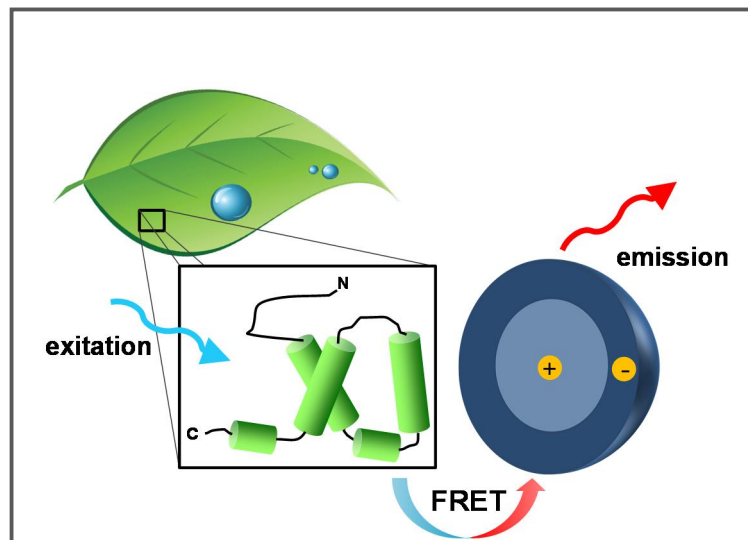
[‡]State Key Laboratory of Coordination Chemistry School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Hankou Road 22, Nanjing, CN 210093

[§]Institut für Physikalische Chemie, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Jakob-Welder-Weg 11, 55099 Mainz, Germany

Supporting Information available

Abstract:

Light-harvesting complex (LHCII) of the photosynthetic apparatus in plants is attached to type-II core-shell CdTe/CdSe/ZnS nanocrystals (quantum dots, QD) exhibiting an absorption band at 710 nm and carrying a dihydrolipoic acid coating for water solubility. LHCII stays functional upon binding to the QD surface and enhances the



light utilization of the QDs significantly, similar to its light-harvesting function in photosynthesis. Electronic excitation energy transfer of about 50 % efficiency is shown by donor (LHCII) fluorescence quenching as well as sensitized acceptor (QD) emission and corroborated by time-resolved fluorescence measurements. The energy transfer efficiency is commensurable with the expected efficiency calculated according to Förster theory on the basis of the estimated donor-acceptor separation. Light harvesting is particularly efficient in the red spectral domain where QD absorption is relatively low. Excitation over the entire visible spectrum is further improved by complementing the biological pigments in LHCII with a dye attached to the apoprotein; the dye has been chosen to absorb in the “green gap” of the LHCII absorption spectrum and transfers its excitation energy ultimately to QD. This is the first report of a biological light-harvesting complex serving an inorganic semiconductor nanocrystal. Due to the charge separation between the core and the shell in type-II QDs the presented LHCII-QD hybrid complexes are potentially interesting for sensitized charge-transfer and photovoltaic applications.

1. Introduction

Semiconductor nanocrystal quantum dots (QDs) have become an important class of nanomaterials with promising potential for, e.g., photovoltaic applications¹ due to their remarkable stability and size- and shape-dependent optical and electronic properties.^{2–4} QDs consisting of a core and shell structure can be classified as type I and type II,³ the latter being capable of light-driven electron–hole separation into the core and shell.^{5,6} Therefore, these particles are interesting candidates for charge separation applications.⁴ QD absorption spectra typically extend over the entire visible spectrum accompanied by a decrease of the extinction coefficient with increasing wavelengths QDs have been shown to be excellent excitation energy donors in fluorescence resonance energy transfer (FRET) with a multitude of acceptors.⁷ Recently, photoluminescent QDs have even been reported to serve as an energy donor to a biological photosynthetic reaction center of purple bacteria.⁸ By contrast, there are only a few examples of QDs acting as energy acceptors. Relatively long photoluminescence lifetimes compared to most commonly used donors and strong direct excitation due to high extinction coefficients over a broad spectral range have been discussed to be the reason.^{7,9} Nevertheless, a naphthalimide dye recently has been reported to act as an energy donor to CdSe/6xZnS QDs in chloroform.¹⁰ Attachment of 30 dyes per QD increased the nanoparticles' light utilization within the UV and blue spectral domain. In the present paper, a biological light-harvesting complex containing some 50 pigments is shown to function as a light harvester for water-soluble type-II CdTe/CdSe/ZnS QDs.^{5,11} This results in a significant rise in the QD light utilization over the entire visible light spectrum, especially in the red and far-red domain, where absorption of QDs is relatively low.

All natural photosynthetic systems, whether in plants or bacteria, contain light-harvesting components. These are not directly involved in charge separation but funnel their excitation energy to the charge-separating reaction centers and, thus, significantly increase the efficiency of light–energy conversion in photosynthesis.¹² Arguably the most abundant light harvesting complex on Earth is the light-harvesting chlorophyll *a/b* complex II (LHCII) of higher plants. In chloroplasts it is predominantly connected to photosystem II and spans the thylakoid membrane with the N-terminal domain protruding into the chloroplast's stroma (stromal side) and the C-terminal domain into the lumen (luminal side). LHCII contains chlorophylls *a* and *b* and carotenoids as light-harvesting pigments and is made up by three monomers oriented in parallel to form a trimer.¹³ The LHCII apoprotein organizes the chlorophylls at an exceptionally high concentration of more than 0.3 M in LHCII crystals,¹⁴ a concentration at which chlorophylls in any solvent would exhibit massive aggregation, quenching their excitation and turning them nonfluorescent.¹⁵ The photostability of LHCII is markedly enhanced by the carotenoids quenching triplet excited states of chlorophylls, thus preventing singlet oxygen from being formed.¹⁶

Use of LHCII as a light harvester outside the photosynthetic apparatus is largely facilitated by the fact that the pigment– protein complex spontaneously self-organizes in vitro. It can be reconstituted by mixing recombinant, i.e., bacterially expressed apoprotein with plant pigments.¹⁷ Trimerization of reconstituted LHCII monomers can then be achieved by affinity chromatography¹⁸ or integration in liposomes.¹⁹ Moreover, the recombinant protein can be engineered to contain anchors such as cysteine sulfhydryls or hexahistidyl (His₆) tags for labeling the protein with fluorescent dyes or attaching it to surfaces, respectively.^{20–22} Finally, its high extinction coefficient $\epsilon(670 \text{ nm}) = 1\,638\,000 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ ²³ makes LHCII particularly interesting as a light harvester for (II–VI)-QDs.

2. Experimental Section

2.1. LHCII Mutants. Recombinant LHCII was reconstituted from a bacterially expressed protein and plant pigments. Wild-type (wt) Lhcb1*2 (AB80) from *Pisum sativum*²⁴ was used as well as its two derivatives, one with an additional hexahistidyl (His₆) tag at the C terminus (wt-h)²⁰ and another one lacking 11 amino acids at the N terminus (Δ N11).¹⁷ The derivative Δ N11-h consists of the same amino acid sequence as Δ N11 but contains a C-terminal His₆ tag. The plasmid coding for Δ N11-h was constructed using the plasmid of wt-h and two primers (forward and reverse) flanking the N-terminal domain on either side so that the product of a PCR reaction with these components carried the deletion. For fluorescence labeling (see below), wt-h was further modified by exchanging cysteine in position 79 with serine and serine in position 160 with cysteine (S160Ch).²⁵

2.2. Preparation and Fluorescence Labeling of LHCII Apoprotein. The proteins were expressed in *Escherichia coli* as described earlier.¹⁷ Protein labeling was performed according to Gundlach et al.²² using a 15-fold excess of dye (Alexa fluor 555- maleimide, Invitrogen, Germany).

2.3. Preparation of Recombinant LHCII Trimers. Total pigment extract, chlorophylls *a* and *b*, and carotenoids were isolated from pea thylakoids.²⁶ Unlabeled and labeled LHCII apoproteins were reconstituted with pigments to form monomeric LHCII by the detergent exchange method,²⁷ and trimerization was carried out by affinity chromatography for His₆ tag-containing LHCII versions¹⁸ or trimerization in liposomes according to ref 19 for LHCII versions without His₆ tag. Lipids were prepared by adding 2.5 mg of phosphatidylglycerol (PG) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) to 1 mL of buffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl). After mixing and sonicating for more than 1 h octyl glucoside (OG) (100 μ L, 10% (w/v)) was added. The lipids were mixed with 1 mg of reconstituted LHCII and vortexed vigorously for 30 s. Polystyrene beads (50 mg) (Biobeads SM-2, Bio-RAD) were added, and the mixture was incubated under constant agitation for 2 h at 4 °C to remove OG.

The mixture was centrifuged briefly, the supernatant was removed to a new tube, fresh Biobeads were added to the supernatant, and the mixture was incubated at 4 °C overnight. This procedure was repeated four times, and finally, the supernatant was collected, mixed with dodecyl-maltoside to a final concentration of 0.5% (w/v), and incubated for 10 min on ice.

For separating monomers and trimers and removing unbound pigments and unfolded protein, the reconstituted complexes were ultracentrifuged through a sucrose density gradient as described earlier²⁸ but with a modified buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.5, 0.1% (w/v) dodecyl maltoside, 0.6 M sucrose). The trimer band was extracted from the sucrose gradient after centrifugation, and its spectroscopic properties were checked by absorption, fluorescence, and CD measurements.¹⁷ The recombinant LHCII complexes contained per 2 lutein molecules about 14 chlorophylls, one neoxanthin, and substoichiometric amounts of violaxanthin.²²

2.4.1. Synthesis of Water-Soluble CdTe/CdSe/ZnS Quantum Dots. *Chemicals.* Trioctylphosphine (TOP, 97%) and tetramethylammonium hydroxide pentahydrate (TMAHP, 98%) were purchased from ABCR; tellurium powder (Te, 99.9999%) was purchased from Alfa Aesar; isopropanol (99.9%) was purchased from Carl Roth; 1-octadecene (ODE, 90%) and myristic acid (MA, 99.5%) were purchased from Acros; oleic acid (OA, laboratory reagent grade), ethyl acetate (99.99%), and methanol (99.99%) were purchased from Fisher Scientific; ethanol (AR) was purchased from VWR International; cadmium oxide (CdO, 99.5%), sulfur (S, 99.98%, powder), zinc oxide powder (ZnO, 99.999%), and selenium powder (Se, 99.5%) were purchased from Aldrich. Tetradecylphosphonic acid (TDPA)²⁹ and dihydrolipoic acid (DHLA)^{30,31} were prepared according to the literature.

2.4.2. Preparation of Stock Solutions. All synthesis steps were carried out in a Schlenk line setup with argon flow protection. The 0.2 M Se–TOP stock solution was prepared by dissolving 79 mg of Se powder in 5 mL of TOP at 100 °C. Te–TOP–ODE (0.1 M) stock solution was prepared by dissolving 128 mg of Te in a 1:1 mixture of 5 mL of TOP and 5 mL of ODE mixture at 210 °C. Cadmium myristate (CdMA) was prepared by dissolving CdO in ODE containing an excess of myristic acid by heating to 310 °C until a clear solution formed. Then the heating mantle was removed, and the flask was cooled down. Methanol and ethanol (v/v 1:1) were added, and the precipitated product was collected by centrifugation, redissolved in toluene, washed with methanol, centrifuged again, and finally dried in an oven at 60 °C. The 0.1 M CdMA–ODE stock solution was obtained by dissolving 566 mg of CdMA in 10 mL of ODE at 80 °C. The 0.1 M S–ODE stock solution was prepared by dissolving 32 mg of sulfur in 10 mL of ODE at 160 °C. The 0.1 M ZnOA–ODE stock solution was prepared by dissolving 204 mg of ZnO in a mixture of 7 mL of oleic acid and 18 mL of ODE at 310 °C.

2.4.3. Synthesis of Type-II QDs. Synthesis of colloidal type-II core/ shell QDs (CdTe/CdSe; CdSe/ZnTe) has been reported by Kim et al.⁵ In our approach, CdTe nanocrystals were prepared via a slightly modified method described in ref 11. CdSe and ZnS shells were grown successively in the crude CdTe core solution at temperatures between 100 and 230 °C to prevent dissolution, growth, and additional nucleation of CdTe particles. For shell growth, a modified successive ion layer absorption and reaction (SILAR) technique was adopted.^{32,33} In a typical synthesis of CdTe/CdSe/ZnS QDs, 26 mg of CdO, 250 mg of TDPA, and 5 mL of ODE were loaded in a 50 mL three-neck flask and heated to 315 °C until the CdO dissolved to form a clear solution. Then 2 mL of Te-TOP-ODE solution was swiftly injected. After reacting for 5 s, the heating mantle was removed and the flask cooled down swiftly to 100 °C by blowing condensed air on the flask outer wall. CdMA-ODE (0.5 mL) and Se-TOP (0.25 mL) were injected at 100 °C. The temperature was raised to 180 °C, kept for 30 min for the first monolayer (ML) CdSe shell growth, and then lowered to 100 °C. For growth of the second ML 0.8 mL of CdMA- ODE and 0.4 mL of Se-TOP were added and the temperature was raised to 190 °C for 40 min. Then, 1.2 mL of CdMA-ODE and 0.6 mL of Se-TOP were injected at 100 °C for the third ML growth, reacting at 200 °C for 40 min. Similar steps were performed to grow the ZnS shell: 2 mL of zinc and sulfur precursors were injected at 100 °C. After raising the temperature to 230 °C the reaction time was set to 40 min. For each step 0.05 mL aliquots were taken before a new cycle of injection to monitor the reaction by UV-vis spectroscopy. The final CdTe/CdSe/ZnS QDs were separated by adding methanol and ethanol (v/v 1:1) and subsequent centrifugation (4000 rpm, 30 min). QDs were redispersed in toluene and stored in a refrigerator at 4 °C.

2.4.4. Preparation of Water-Dispersible Type-II QDs. The type-II QDs in nonpolar solvent (toluene) were transferred into water by the ligand exchange reaction.³⁴ Typically, 50 µL of DHLA was dissolved in 10 mL of isopropanol, and the pH of the solution was adjusted to 12– 13 with TMAHP. Then 4.2×10^{15} QDs in 1 mL of toluene were added. After 10 min of shaking, 40 mL of ethyl acetate was added to precipitate the QDs. QDs were separated by centrifugation (4000 rpm, 20 min) and redispersed in 2 mL of water. The phase transfer yield was close to 100%.

The concentration of type-II QDs was taken to correspond to that of the CdTe cores before shell growth, assuming there was no decomposition and no new nucleation of CdTe cores during shell growth. The concentration of the CdSe cores has been determined by a procedure described in the literature.³⁵ As mentioned before, particle transfer into the aqueous phase occurred almost quantitatively.

2.5. Assembly of LHCII and Type-II QDs. For titrating LHCII binding to QD and vice versa, both components were mixed on ice with tris(2-carboxyethyl) phosphine (2 mM) and buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.5, 0.1% (w/v) dodecyl maltoside, 0.6 M sucrose) to a final volume of 500 μL . Either the QD or LHCII trimer concentration was kept constant at 15 nM, whereas the concentration of the other component was varied to arrive at molar ratios between 0.5 and 5. Mixtures were incubated for 90 min on ice.

2.6. Characterization of Type-II QDs, LHCII, and Hybrid Complexes. Morphologies of the QDs were measured with a Philips EM-420 transmission electron microscope (TEM) operating at an acceleration voltage of 120 kV. TEM samples were prepared by depositing the organic solutions containing QDs onto copper grids with carbon film support.

UV-vis absorption spectra were measured at room temperature using an Omega-20 spectrometer (Bruins Instruments) or a V550 UV-vis spectrophotometer (Jasco, Germany). The concentration of LHCII was determined using an extinction coefficient of $\epsilon(670 \text{ nm}) = 1\,638\,000 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$.²³

Photoluminescence (PL) spectra were recorded with a Fluoromax-2 spectrometer (Jobin Yvon, Germany). Spectra were corrected for the wavelength-dependent sensitivity of the fluorometer. The QD fluorescence quantum yields were estimated by comparing their fluorescence intensity with that of LHCII solutions possessing the same optical density at the excitation wavelength. The LHCII fluorescence quantum yield was determined to be 0.2 as described earlier.²² For energy transfer calculations, emission spectra of LHCII-QD adducts were expressed as sums of the emission spectra of LHCII and QD alone, and spectral contributions were integrated.

2.7. Fluorescence Lifetime Measurements. Time-resolved fluorescence measurements were performed on a FluoroLog-3 spectrofluorometer using the time-correlated single-photon counting (TCSPC) technique. For pulsed excitation an ultrabroadband supercontinuum fiber laser (SC-450-PP-AOTF, Fianium Ltd.) delivering light pulses at $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ with a length of $\tau_{\text{p}} \approx 100 \text{ ps}$ was used. Depending on whether the QD or the LHCII fluorescence was recorded, the repetition rate ν_{rep} had to be adjusted to 2 or 10 MHz, respectively, in order to ensure an almost complete decay of the fluorescence to the background level. In the detection path a fast single-photon avalanche diode (SPAD, 50 ps, MPD-2CTA, PicoQuant) coupled to the exit slit of the emission monochromator was connected to a time-to-digital converter (TDC) of a TCSPC unit (PicoHarp 300, PicoQuant). Depending on the repetition rate the photon arrival times with respect to the laser pulses were recorded with an accuracy of 8 or 16 ps within a time range of 100 or 500 ns, respectively. The overall time resolution of the setup was determined by the fwhm (full width at half maximum) of the instrumental response function (IRF, $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$)

to ~ 140 ps. Data analysis was performed with an integrated data manipulation/visualization package (Igor Pro 6.21, Wavemetrics, Lake Oswego, OR).

3. Results and Discussion

3.1. Light-Harvesting Chlorophyll a/b Complex (LHCII) Transfers Excitation Energy to Type-II CdTe/CdSe/ZnS QDs. As shown previously with type-I QDs,³⁶ LHCII binds to QDs via electrostatic interaction between a cluster of positive charges in the N-terminal protein domain and the negatively charged DHLA coat of the QDs. The LHCII version wt-h carries a His₆ tag engineered into the protein's C terminus, which also promotes binding, presumably by interaction with Zn²⁺ ions exposed at the surface of the particles. If QDs were aged at room temperature in aqueous solution for several weeks, part of the DHLA ligands dissociated from the QD surface. In this case we observed weaker binding of an LHCII version lacking the His₆ tag (wt), binding only via its cluster of positive charges (see Figure S1 of the Supporting Information). Thus, wt binding could be used as a control for an intact DHLA coating of the QDs. All experiments in this work were performed with fresh QD preparations fulfilling this criterion. Since the LHCII emission spectrum strongly overlaps with the QD absorption spectrum (see Figure S2 of the Supporting Information), electronic excitation energy transfer (EET) is expected to take place between LHCII and QD. To verify this, absorption and fluorescence spectra were measured of LHCII– QD complexes. As controls, pure LHCII and pure QDs samples were studied at the same concentrations and under the same conditions. All experiments in this work were performed with trimeric LHCII.

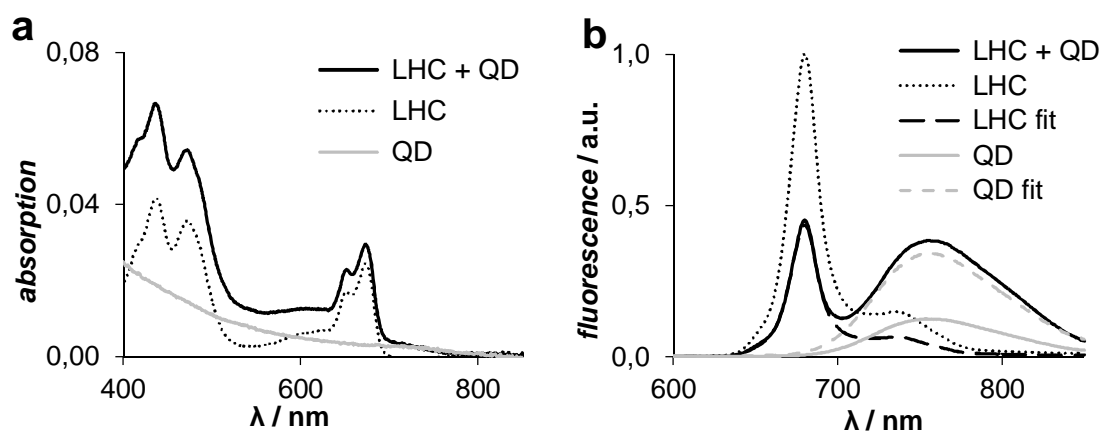


Figure 1. LHCII (wt-h) transfers its energy to CdTe/3xCdSe/ZnS-DHLA QDs. (a) Absorption and (b) emission spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) of QDs with (solid black line) and without LHCII (gray line) and pure LHCII (dotted black line). Hybrid complex emission spectrum was expressed as the sum of the spectra of the individual components (dashed lines). Concentration of LHCII and QDs was 15 nM; all samples were measured in the same buffer.

Wt-h was mixed with an equimolar amount of QDs, and the sample was excited at 470 nm, where the absorption of the LHCII is significantly higher than that of the QDs (Figure 1a). At 470 nm preferentially chlorophyll *b* is excited in the LHCII. Even so, all of the LHCII emission is seen at 680 nm, the chlorophyll *a* emission wavelength, and not at 660 nm, where chlorophyll *b* emits. This indicates efficient intramolecular energy transfer from chlorophyll *b* to *a*, which is a functional test for LHCII and proves that LHCII (wt-h) is structurally intact when bound to QD.

The LHCII emission in LHCII–QD complexes at 680 nm was significantly quenched compared to that in the absence of QDs (Figure 1 b, black solid line and black dotted line). QDs are also excited at 470 nm due to their broad absorption within the visible spectral domain (Figure 1 a) and emit around 760 nm (gray solid line in Figure 1 b). However, emission of the LHCII–QD complex upon excitation at 470 nm is significantly more intense than that of QD alone, indicating that a large part of the QD emission is sensitized by LHCII (wt-h). Both donor (LHCII) fluorescence quenching and sensitized acceptor (QD) emission are indicative of energy transfer from LHCII (wt-h) to QD.

To verify that LHCII–QD energy transfer depends on complex formation between QD and LHCII, similar fluorescence measurements were performed on QDs mixed with a mutant version of LHCII (Δ N11) lacking both the positively charged section of its N-terminal domain and the His₆ tag. Neither donor quenching nor sensitized acceptor emission occurred (see Figure S3 of the Supporting Information). Thus, energy transfer takes place only if LHCII contains affinity sequences for binding to QDs.

Donor fluorescence quenching can be taken as a direct measure of the energy transfer efficiency E_{ss} , provided the fluorescence quantum yield of the donor is not altered by some other effects. The energy transfer efficiency was calculated from emission spectra by the following equation³⁷

$$E_{ss} = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \quad (1)$$

where I_{DA} is the donor emission in the presence of the acceptor and I_D the donor emission in the absence of the acceptor. To evaluate donor quenching, the spectral contributions of donor and acceptor in LHCII–QD complexes needed to be quantified. To this end, their emission was expressed as the sum of the spectra of the individual components (Figure 1b, dashed lines). Comparing the integrated emission intensity of LHCII alone (I_D , donor in the absence of the acceptor) with the one of LHCII in LHCII–QD complex (I_{DA} , donor in the presence of the acceptor) yields an apparent energy transfer efficiency E_{ss} of 0.56 in a 1:1 mixture of QDs and LHCII (wth).

In Förster-type energy transfer, quenching of donor fluorescence is accompanied by an equivalent sensitized emission of the (fluorescent) acceptor. In other words, the decrease in the area underneath the donor emission spectrum ($A_{q(\text{LHCII})}$) should be the same as the increase in the area underneath the acceptor emission spectrum ($A_{s(\text{D})}$) if both areas are weighted by the fluorescence quantum yields (ϕ_F) of donor and acceptor, respectively. With $\phi_{F(\text{LHCII})} = 0.2$ and $\phi_{F(\text{QD})} = 0.2$ (see section 2.6), A_s/A_q is expected to be 1. The calculated value of $A_s/A_q = 1.1$ for the hybrid complexes is very close to unity, so the sensitized QD emission is nearly equivalent to the quenched LHCII emission.

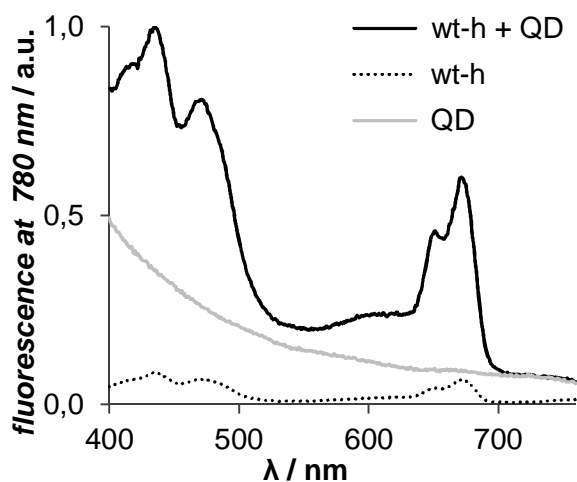


Figure 2. LHCII (wt-h) coupled to QDs sensitize QD fluorescence. Excitation spectra ($\lambda_{em} = 780$ nm) of QD with (solid black line) and without LHCII (solid gray line) and pure LHCII (dotted black line). Concentration of the LHCII and QDs was 15 nM; all samples were measured in the same buffer.

To confirm the notion of energy transfer between the LHCII version wt-h and QDs, excitation spectra of the LHCII–QD hybrid complexes and the pure components were recorded (Figure 2). The detection wavelength was set to 780 nm, near the emission maximum of QDs, whereas the LHCII emission is comparatively weak at this wavelength (see Figure 1b). The excitation spectrum of the hybrid complexes (black line) exhibits a higher fluorescence intensity throughout than that of QD alone and bears some similarity to the absorption spectrum of the LHCII (see Figure 1a), indicating stimulation of QD emission due to LHCII excitation. The increase in the excitation signal of LHCII–QD complexes compared to QDs alone cannot be attributed to emission of coexcited LHCII, as the latter contribution is very weak (dotted black spectrum in Figure 2). Consequently, energy transfer from LHCII (wt-h) to QD significantly enhances light utilization of the QDs.

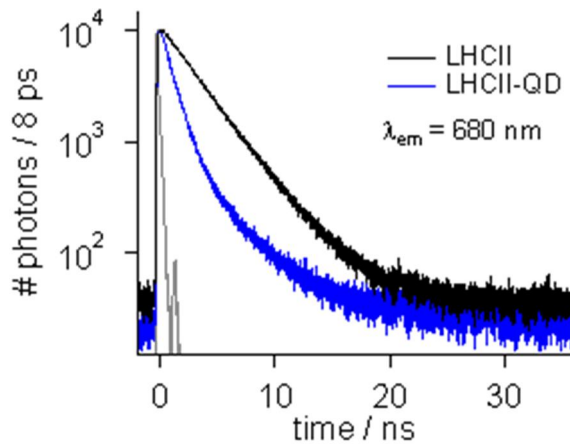


Figure 3. Fluorescence rise/decay time profiles ($\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) of the pure LHCII (wt-h) (black line) and LHCII-QD complexes (blue line) at $\lambda_{\text{em}} = 680$ nm. All samples were measured in the same buffer solution, and the spectral bandwidth of the emission monochromator was set to $\Delta\lambda_{\text{em}} = 14.5$ nm. Additionally, the instrumental response function (IRF, gray line) measured at $\lambda_{\text{em}} = 470$ nm (fwhm ≈ 140 ps) is shown. Time profiles were analyzed in terms of an iterative reconvolution fit according to eq 2, and the individual amplitudes A_i and decay times τ_i are summarized in Table S1 (Supporting Information).

Energy transfer has further been verified by measuring time-resolved fluorescence of the LHCII-QD complex systems and LHCII (wt-h) in the absence of QDs. The fluorescence rise/decay time profiles of the LHCII-QD complexes (blue line) and the isolated LHCII (black line) recorded at an emission wavelength of 680 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm, $\Delta\lambda_{\text{em}} = 14.5$ nm) are shown in Figure 3 together with the instrumental response function (IRF, gray line) measured at $\lambda_{\text{em}} = 470$ nm. Both time profiles were fitted with a sum of exponential functions ($n \leq 3$) convoluted with the IRF

$$I_{\text{fl}}(t) = \left[\sum_{i=1}^n A_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \right] \otimes \text{IRF}(t) + B \quad (2)$$

The contribution of background fluorescence and stray light is included in the additive parameter B . The amplitude-weighted average decay times are $\langle \tau \rangle_{\text{LHCII}} = 3.0$ ns and $\langle \tau \rangle_{\text{LHCII-QD}}^{680\text{nm}} = 1.1$ ns for the pure LHCII (wt-h) and LHCII-QD complexes, respectively. The individual amplitudes A_i and time constants τ_i as well as the amplitude-weighted average decay times $\langle \tau \rangle = \sum_{i=1}^{n \leq 3} A_i \cdot \tau_i$ are given in Table S1 (Supporting Information).³⁷ In contrast to the fluorescence decay of pure LHCII a sum of three exponentials had to be used to sufficiently describe the time profile of the LHCII-QD complexes, with the longest decay component ($\tau_3 = 10$ ns) being attributed to residual fluorescence of the QDs at 680 nm (see Figure 1b). The fluorescence lifetime of unbound LHCII $\langle \tau \rangle_{\text{LHCII}}$ is in accordance with previously reported values³⁸⁻⁴⁰ ranging between 3 and 4 ns. The significantly lower average $\langle \tau \rangle_{\text{LHCII-QD}}^{680\text{nm}}$ decay time of the complexes at 680 nm is attributed to fluorescence quenching due to efficient excitation energy transfer from LHCII (energy donor) to QD (energy acceptor). In order to verify that this shortening of the fluorescence decay time to ~ 1 ns does not arise from directly excited QDs in the complexes emitting at 680 nm (see Figure 1b), we recorded the rise/decay time profile of the pure QDs in buffer solution at an emission wavelength of $\lambda_{\text{em}} = 750$ nm (maximum of the QD emission). The

measured trace is shown in Figure S4 (Supporting Information), and a detailed analysis according to eq 2 reveals three decay time constants, which are given in Table S1 (Supporting Information). The shortest time component was found to be $\tau_1 = 4.0$ ns, which clearly differs from the average decay time one found for the complexes $\langle \tau \rangle_{\text{LHCII-QD}}^{680\text{nm}} = 1.1$ ns).

To assess also the sensitized acceptor emission in time-resolved fluorescence measurements, we recorded the rise/ decay time profile of QD and LHCII–QD complexes at 750 nm, the maximum wavelength of QD emission. As shown in detail in Figure S4 (Supporting Information), no rise time component was detected that could be attributed to sensitized QD emission. This does not, however, rule out the notion of energy transfer from LHCII to QD since this rise time component presumably was obscured by LHCII emission (for more detailed information see the Supporting Information).

Since the amplitude-weighted average decay time is proportional to the integrated intensity of the decay profile and therefore to the integrated intensity of the corresponding steady-state spectrum, in analogy to eq 1 the energy transfer efficiency can be calculated according to³⁷

$$E_{\text{TCSPC}} = 1 - \frac{\langle \tau \rangle_{\text{LHCII-QD}}^{680\text{nm}}}{\langle \tau \rangle_{\text{LHCII}}} \quad (3)$$

With the average decay times stated above the efficiency of energy transfer amounts to $E_{\text{TCSPC}} = 0.63$, which is in good agreement with the transfer efficiency calculated above from the steady-state measurements ($E_{\text{SS}} = 0.56$).

Thus far most combinations of CdSe/ZnS QDs as energy acceptors with organic donor dyes have been reported to show no detectable FRET.⁹ This has been attributed to the much longer exciton lifetime of the QDs (~9 ns) compared to that of the dyes (~1 ns), making energy transfer slow in comparison to deactivation channels in the donor. Moreover, the QDs showed substantial coexcitation, due to their high extinction coefficient, at the excitation wavelength of the donor dye. When a terbium chelate complex with a relatively long exciton lifetime (1500 μs) was used as a donor, FRET was observed.⁴¹ Recently, a naphthalimide dye was found to transfer its excitation energy to CdSe/ZnS core/shell/shell QDs.¹⁰ With 30 dye molecules bound per QD in organic solvent, the light utilization of the QDs increased only slightly in the UV and blue spectral region, due to the relatively low extinction coefficient of this dye. In the present work efficient energy transfer was demonstrated from a photosynthetic light-harvesting complex which increased the light utilization of the QDs in the UV and over almost the entire visible spectrum. Trimeric LHCII contains about 40 Chl molecules and about 10 carotenoids that are all coupled in fast exciton transfer;⁴² thus, in principle, they can all transfer their excitation energy to the QD acceptor. This explains why LHCII is an efficient light harvester. The fluorescence lifetime of LHCII (around 3 ns, see Figure 3) is quite similar to that of many organic dyes.

3.2. Estimation of the Förster Distances and Expected Energy Transfer Efficiencies between LHCII and QD. To estimate the Förster distance (R_0) of a donor–acceptor pair, i.e., the distance at which an energy transfer efficiency of 50% is expected, the following equation was used³⁷

$$R_0 = 0.021 \left[\kappa^2 * \eta^{-4} * \phi_F * J(\lambda) \right]^{1/6} \quad (4)$$

Here κ^2 is the orientation factor, η the refractive index of the solvent, ϕ_F the fluorescence quantum yield of the donor (LHCII), 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)⁴³ were used.

The spectral overlap integral was calculated with³⁷

$$J(\lambda) = \left[\int F_D(\lambda) * \epsilon_A * \lambda^4 d\lambda \right] / \left[F_D(\lambda) d\lambda \right] \quad (5)$$

where F_D is the fluorescence intensity of the donor (LHCII), ϵ_A the molar extinction coefficient of the acceptor (QD), and λ the wavelength. The estimated QD concentration (see section 2.4.4) and the measured QD absorption spectrum were used to calculate the extinction coefficients at the required wavelengths. Within the limitations of our approach the Förster distance (R_0) was calculated with eq 4 to be 6.4 ± 0.7 nm for the donor–acceptor pair LHCII–QD.

Upon excitation of LHCII the excitation energy is thought to be rapidly equilibrated between the chlorophylls and localized predominantly at the long-wavelength chlorophyll *a1* as the final emitter.⁴² Therefore, the donor–acceptor separation was taken to be the distance between chlorophyll *a1* and the center of the QD as a first approximation. Since the minimum distance was to be estimated, we assumed the stromal or luminal surfaces of LHCII to be immediately touching the QD surface. The distance of chlorophyll *a1* to the stromal or luminal surface of the protein was taken from the LHCII crystal structure to be 1.5 or 3.0 nm, respectively.¹⁴ The QD radius is 3.1 nm (see Figure S5 of the Supporting Information); hence, the distance between chlorophyll *a1* and a QD attached to the C terminus of LHCII is at least 6.1 nm. If LHCII binds to QD via its N terminus, it interacts with the DHLA coating, which adds an estimated 1.0 nm to the QD radius;³⁶ thus, the minimum donor–acceptor separation in this case is 5.6 nm.

The estimated Förster distance of 6.4 nm is close to the minimum donor–acceptor separations taken from structural information. Therefore, the apparent energy transfer efficiency is expected to be well below 100%. The maximum expected energy transfer efficiencies (E_{EET})

were calculated from the minimum donor–acceptor separations according to the following equation

$$E_{ET}(r) = \left(\frac{1}{1 + (r_{DA}/R_0)^6} \right) \quad (6)$$

where R_0 is the Förster distance (see eq 4) and r_{DA} the donor– acceptor distance. With the minimum donor–acceptor distances taken from the structure (see above) the maximum expected energy transfer efficiency for LHCII attached via its N or C terminus is 68% or 57%, respectively.

Thus, the observed energy transfer efficiencies are in reasonable agreement with the efficiencies expected by Förster theory. Moreover, our steady-state measurements of energy transfer between LHCII and QD donor (LHCII) quenching matched sensitized acceptor (QD) emission. In addition, the fluorescence lifetime measurements exhibited a decreased excited state lifetime of the donor fluorophore (LHCII) upon adding the acceptor (QD). Taken together, these observations strongly suggest that LHCII transfers its excitation energy to QD according to the FRET mechanism.

3.3. Donor Quenching Saturates at Around 50%. Energy transfer measurements shown so far have been performed with 1:1 mixtures of LHCII and QDs at 15 nM concentrations. If the affinity between LHCII (wt-h) and QD is high enough for quantitative complex formation, then the 56% donor quenching observed (see Figure 1b) would mean that the energy transfer efficiency for this donor–acceptor pair is 0.56. However, the same observation would also be consistent with only 56% of LHCII complexes being bound to QDs and transferring their excitation energy with an efficiency of 1. To distinguish between both scenarios, LHCII (wt-h) was titrated with excess amounts of QDs. Figure 4 (wt-h) shows that saturation of the transfer efficiency is almost reached at a molar ratio of $QD/LHCII = 2$, with 65% of the LHCII fluorescence being quenched.

The LHCII version wt-h contains two binding sequences interacting with the QD surface. A His₆ tag presumably binds to exposed Zn²⁺ ions of the ZnS coating, and a cluster of positive charges in the N-terminal domain of the protein electrostatically interacts with the DHLA ligands. The same LHCII protein version was used in our previous study,³⁶ except that in the present work trimeric LHCII was used throughout. The three monomers within an LHCII trimer are arranged in parallel to each other; therefore, all three N termini of the apoproteins are located on one side of the trimeric complex, whereas the C termini point to the opposite surface. Consequently, the three positive-charge clusters or the three His₆ tags in an LHCII trimer can bind cooperatively to the QD surface.

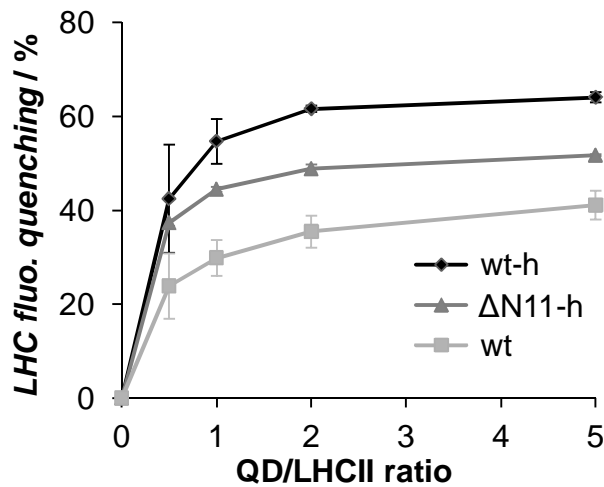


Figure 4. Quenching of LHCII fluorescence saturates in a titration with QD. Constant concentration of LHCII (15 nM) was mixed with different QD concentrations (QD/LHCII ratios of 0.5, 1, 2, and 5). Fluorescence emission spectra of the samples and pure LHCII (15 nM) were measured twice ($\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm), and calculated percentages of donor fluorescence quenching were plotted against the QD/LHCII ratio (standard deviation of two independent measurements; where no error bar appears, it would be smaller than the height of the symbol). Measurements were performed with three different LHCII mutants: wt-h, Δ N11-h, and wt.

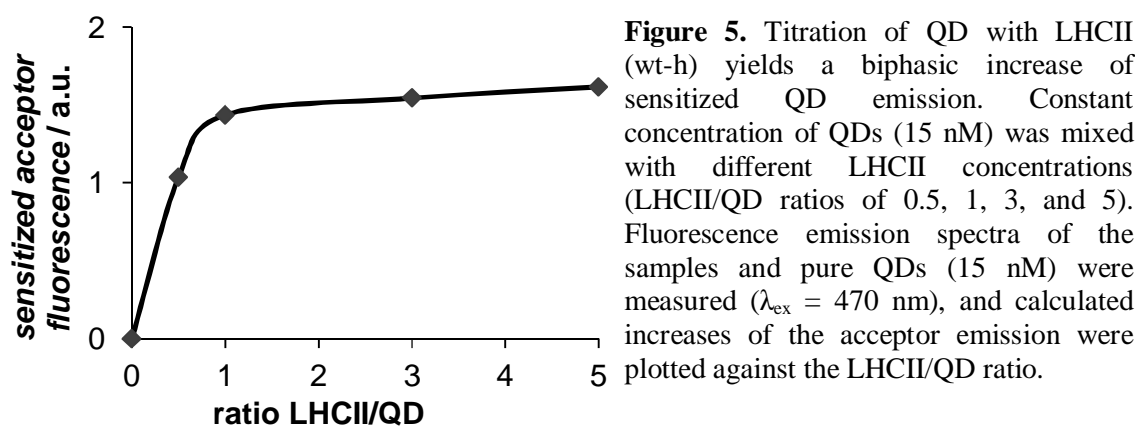
To determine the individual contributions of the N-terminal domain and the His₆ tag to LHCII binding and, consequently, energy transfer, the same measurements were performed with two LHCII versions containing only one affinity tag per apoprotein, i.e., only the His₆-tag (Δ N11-h, Figure 4) or only the N terminus (wt, Figure 4). As observed with the LHCII with both affinity sequences (wt-h), the saturation of energy transfer is nearly reached at a molar ratio of 2 QD per LHCII. However, with LHCII versions containing only one affinity tag in their protein component, maximum quenching was only 52% (Δ N11-h) and 41% (wt). The former value is close to the maximum expected energy transfer of 57% as calculated from the minimum donor–acceptor separation in C-terminally bound LHCII–QD complexes (see results in section 3.2). In N-terminally bound complexes the expected energy transfer was calculated to be below 68%, whereas the measured value is 41%. This difference may reflect the fact that the N-terminal domain carrying the positively charged binding sequence is quite flexible; thus, the actual LHCII–QD separation is likely to be larger than the estimated minimum distance. It should be noted that the expected energy transfer efficiency can only be a rough estimate because, among other reasons, the QD concentration used to calculate the critical Förster distance R_0 cannot be precisely determined. Yet, if the QD concentration used for the calculations above is doubled or cut in half, then the resulting upper and lower margins of R_0 would be 7.2 and 5.7 nm, respectively. However, even with an upper margin of R_0 and a donor–acceptor separation of 5.1 nm, the expected energy transfer efficiency would only be 80%. The higher energy transfer efficiency from wt-h to QD at saturating amounts of 0.65 (Figure 4) is consistent with the possibility that this LHCII version can interact with two QDs simultaneously via its His₆ and positively charged tags.

In a 1:1 mixture at 15 nM, more than 80% of the maximum quenching in wt-h and Δ N11-h is observed, indicating that 80% of the LHCII are bound to a QD (assuming that at saturation all LHCII is bound to QD). For the LHCII binding via its N-terminal protein domain (wt) the

fluorescence quenching at QD/LHCII = 1 is less than 75% of the maximum quenching efficiency observed at a 5-fold excess amount of QD, indicating that wt binds to QD less strongly than the other LHCII versions containing a His₆ affinity tag. To estimate an apparent binding constant, the percentage of QD-bound LHCII was calculated by comparing the donor quenching of 15 nM LHCII in a 1:1 mixture with QDs to its maximal quenching at saturating amounts of QD (see Figure 4). The binding constant was then determined by the following equation

$$K_a [M^{-1}] = \frac{[QD - LHCII]}{[QD][LHCII]} \quad (7)$$

It was found to be approximately 3 nM⁻¹ for wt-h and ΔN11-h, whereas the one of wt is below 0.8 nM⁻¹. The latter value is a lower estimate since the titration may not yet have reached saturation at QD/LHCII = 5.



In comparison to the experiments with the LHCII concentration kept constant, a slightly different picture arose when we kept the concentration of QD fixed and titrated the LHCII (wt-h) amount, monitoring the sensitized acceptor emission of the QDs (Figure 5). The titration curve appeared biphasic with a steep rise in sensitized acceptor emission up to equimolarity and a much shallower rise at higher excess amounts of LHCII. The QDs used in this work can presumably accommodate more than one LHCII on their surface. If more than one LHCII can be bound with a similar binding constant,

this means that the second and further LHCII molecules bound to QD give rise to much less apparent energy transfer than the first LHCII. If, on the other hand, all bound LHCII transfer their energy with comparable efficiencies, then all further LHCII must bind with a much smaller binding constant compared to the first LHCII.

Assuming the QDs to be spherical with a diameter of 6.2 nm and a footprint of LHCII trimers taken from their crystal structure¹⁴ of $\sim 40 \text{ nm}^2$, up to 3 LHCII trimers can be arranged

around one QD. Taking into account, however, that the LHCII structure is partially flexible and therefore is able to partially wrap around the QD surface, the first LHCII bound to a QD is likely to interfere with the binding of additional LHCII. This scenario is consistent with the titration curve of QDs with an excess amount of LHCII: the first steep and the second shallower rise may represent the binding of the first and second LHCII with high and lower affinities, respectively (see Figure 5).

As an alternative explanation of the biphasic rise in QD emission upon titrating QDs with increasing amounts of LHCII, a second or third LHCII bound may contribute less than the first one to sensitized QD emission because QD excitation via energy transfer from LHCII reaches saturation. This would mean that QD excitation in QD-LHCII complexes is in a nonlinear regime. We excluded this scenario by finding that the fluorescence emission intensity of QDs titrated with an excess amount of LHCII bound rose by a factor of 2 when the excitation light intensity was doubled (not shown). Therefore, we are left with the interpretation that upon formation of a 1:1 LHCII-QD complex further LHCII bind at a lower affinity. Binding experiments using indicators other than energy transfer are in progress to clarify this point.

3.4. Absorption Cross Section of LHCII-QD Complexes Can Further Be Increased by Fluorescent Dyes Attached to LHCII. As seen in Figure 2, the increase of the QD's light utilization by addition of LHCII as a light harvester spans the entire visible spectrum; only in the green spectral domain around 550 nm the absorption of the hybrid complex is relatively weak due to the "green gap" in chlorophyll absorption. Previously we showed that this green gap in LHCII absorption can at least in part be filled in by attaching one or more fluorescent dye(s) to the protein such as rhodamine that absorbs in this spectral domain and then transfers its excitation energy to the LHCII chlorophylls.²² We show here that the same principle can be used to improve the absorption of QD-LHCII hybrid complexes in this spectral domain. We used the commercial dye Alexa Fluor 555 because its extinction coefficient $\epsilon(556 \text{ nm}) = 158\,000 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ (in a protein environment) is even higher than that of rhodamine. The dye was attached via its maleimide group to the cysteine sulfhydryl group in position 160 in the stromal loop domain of the LHCII mutant (S160Ch). If the fluorescence excitation spectrum ($\lambda_{\text{em}} = 780 \text{ nm}$) of the triad QD-LHCII-dye (Figure 6) is compared to that of the dyad QD-LHCII (see Figure 2), it is obvious that addition of the dye improves the absorption of the complex at around 550 nm. The additional absorption shown in the green spectral domain is small but proves the principle. We have shown earlier that LHCII labeled with several dyes can absorb more evenly over the entire solar spectrum in the visible domain.²²

In this paper we have shown that LHCII significantly adds to QD excitation over virtually the entire visible spectrum (see Figure 2). In principle, LHCII is expected to work as an efficient donor for other QDs too, as long as their absorption extends to about 680 nm. Although the maximum extinction coefficients of semiconductor nanocrystals are large and increase with their diameter, their absorption spectra decline toward longer wavelengths.³⁵ Since the molar extinction coefficient of LHCII in the red spectral domain is much larger than that of most QDs, QD–LHCII complexes are able to absorb and use solar radiation at these wavelengths significantly more efficiently than the QDs alone. LHCII–QD constructs may therefore be useful for biomimetic light harvesting in photovoltaic and other applications. The usefulness of the LHCII on a technical scale is limited due to the fact that its photostability, although exceptionally high according to biological standards, is not high enough yet for technical applications under long-term exposure to high light intensities and high temperatures. Experiments to stabilize LHCII by (bio)chemical modification are underway. Alternatively, the ability of LHCII to self-organize and, consequently, undergo self-repair may compensate for its limited long-term stability.

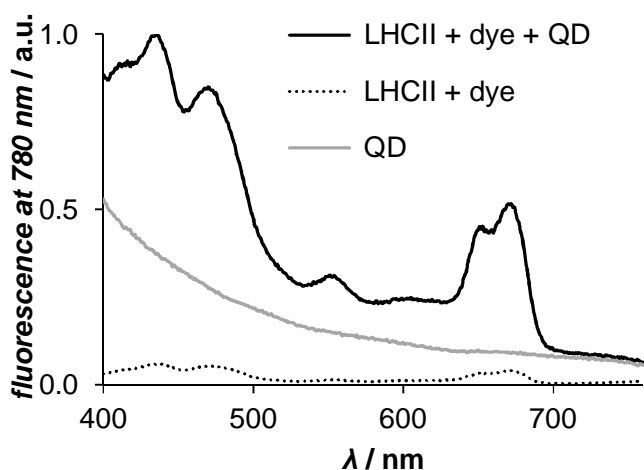


Figure 6. Organic dye attached to LHCII (S160Ch) enhances light utilization of QD. Excitation spectra ($\lambda_{em} = 780$ nm) of QD with (solid black line) and without dye-labeled LHCII (solid gray line) and pure labeled LHCII (dotted black line). Concentration of the labeled LHCII and QDs was 15 nM; all samples were measured in the same buffer.

4. Conclusions

In this study we present a hybrid structure of a biological light-harvesting protein and inorganic type-II core–shell QDs. The LHCII complexes efficiently transfer their electronic excitation energy to the QDs and therefore increase the light-energy utilization of the semiconductor nanocrystals. This increase can even be enhanced by attaching dyes to LHCII that absorb in the “green gap” of chlorophyll absorption. An enlarged absorptivity over the entire visible spectrum may make QDs more useful in some applications in cases where efficient light usage is required more than long-term stability. Work to improve the stability of the biological light-harvesting complexes is underway.

■ Associated Content

Supporting Information

Additional table and figures; rise time of the sensitized QD emissions is obscured by LHCI emission. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ Author Information

Corresponding Author

*E-mail: paulsen@uni-mainz.de.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ Acknowledgments

This work was funded by DFG (SFB 625, TP B7, to T.B. and H.P.) and in initial part by Stiftung Volkswagenwerk (I/82072, to T.B. and H.P.).

■ References

- (1) Kamat, P. V.; Tvrdy, K.; Baker; Radich, J. G. Beyond photovoltaics: Semiconductor nanoarchitectures for liquid-junction solar cells. *Chem. Rev.* **2010**, 110, 6664–6688.
- (2) Alivisatos, A. P. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science* **1996**, 271, 933–937.
- (3) In *Semiconductor nanocrystal quantum dots*; Rogach, A., Ed.; Springer: Wien, 2008.
- (4) Smith, A. W.; Nie, S. Semiconductor nanocrystals: structure, properties, and band gap engineering. *Acc. Chem. Res.* **2010**, 43, 190–200.
- (5) Kim, S.; Fisher, B.; Eisler, H. J.; Bawendi, M. Type-II quantum dots: CdTe/CdSe(core/shell) and CdSe/ZnTe(core/shell) heterostructures. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11466–11467.
- (6) Xie, R. G.; Zhong, X. H.; Basché, T. Synthesis, characterization, and spectroscopy of type-II core/shell semiconductor nanocrystals with ZnTe cores. *Adv. Mater.* **2005**, 17, 2741–2745.
- (7) Medintz, I. L.; Mattousi, H. Quantum dot-based resonance energy transfer and its growing application in biology. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, 11, 17–45.
- (8) Nabiev, I.; Rakovich, A.; Sukhanova, A.; Lukashev, E.; Zagidullin, V.; Pachenko, V.; Rakovich, Y. P.; Donegan, J. F.; Rubin, A. B.; Govorov, A. O. Fluorescent quantum dots as artificial antennas for enhanced light harvesting and energy transfer to photosynthetic reaction centers. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, 49, 7217–7221.

- (9) Clapp, A. R.; Medintz, I. L.; Fisher, B. R.; Anderson, G. P.; Mattoussi, H. Can luminescent quantum dots be efficient energy acceptors with organic dye donors? *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1242–1250.
- (10) Xu, H.; Huang, X. M.; Zhang, W. J.; Chen, G. J.; Zhu, W. H.; Zhong, X. H. Quantum dots acting as energy acceptors with organic dyes as donors in solution. *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 3167–3171.
- (11) Yu, W. W.; Wang, Y. A.; Peng, X. G. Formation and stability of size-, shape-, and structure-controlled CdTe nanocrystals: Ligand effects on monomers and nanocrystals. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 4300–4308.
- (12) Cogdell, R. J.; Gardiner, A. T.; Hashimoto, H.; Brotosudarmo, T. H. P. A comparative look at the first few milliseconds of the light reaction of photosynthesis. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 1150–1158.
- (13) Schmid, V. H. R. Light-harvesting complexes of vascular plants. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 3619–3639.
- (14) Standfuss, R.; van Scheltinga, A. C. T.; Lamborghini, M.; Kühlbrandt, W. Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* **2005**, *24*, 919–928.
- (15) Beddard, G. S.; Porter, G. Concentration quenching in chlorophyll. *Nature* **1976**, *260*, 366–376.
- (16) Polivka, T.; Frank, H. A. Molecular factors controlling photosynthetic light harvesting by carotenoids. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 1125–1134.
- (17) Paulsen, H.; Rümmler, U.; Rüdiger, W. Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll *a/b* binding protein overexpressed in *E. coli*. *Planta* **1990**, *181*, 204–211.
- (18) Yang, C.; Horn, R.; Paulsen, H. The light-harvesting chlorophyll *a/b* complex can be reconstituted in vitro from its completely unfolded apoprotein. *Biochemistry* **2003**, *42*, 4527–4533.
- (19) Yang, C. H.; Boggasch, S.; Haase, W.; Paulsen, H. Thermal stability of trimeric light-harvesting chlorophyll *a/b* complex (LHCIIb) in liposomes of thylakoid lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1757*, 1642–1648.
- (20) Kosemund, K.; Geiger, I.; Paulsen, H. Insertion of light harvesting chlorophyll *a/b* protein into the thylakoid – Topographical studies. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1138–1145.
- (21) Liu, J.; Lauterbach, R.; Paulsen, H.; Knoll, W. Immobilization of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex (LHCIIb) studied by surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy. *Langmuir* **2008**, *24*, 9661–9667.

- (22) Gundlach, K.; Werwie, M.; Wiegand, S.; Paulsen, H. Filling the "green gap" of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex by covalent attachment of Rhodamine Red. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2009**, 1787, 1499–1504.
- (23) Butler, P. J. G.; Kühlbrandt, W. 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.* **1988**, 85, 3797–3801.
- (24) Cashmore, A. R. Structure and expression of a pea nuclear gene encoding a light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, 81, 2960–2964.
- (25) Jeschke, G.; Bender, A.; Schweikardt, T.; Panek, G.; Decker, H.; Paulsen, H. Localization of the N-terminal domain in light-harvesting chlorophyll *a/b* protein (LHCIIb) by electron paramagnetic resonance (EPR) measurements. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 18623–18630.
- (26) Booth, P.; Paulsen, H. Assembly of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex in vitro. Time-resolved fluorescence measurements. *Biochemistry* **1996**, 35, 5103–5108.
- (27) Paulsen, H.; Finkenzeller, B.; Kühlein, N. Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein. *Eur. J. Biochem.* **1993**, 215, 809–816.
- (28) Hobe, S.; Prytulla, S.; Kühlbrandt, W.; Paulsen, H. Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *EMBO J.* **1994**, 13, 3423–3429.
- (29) Wu, S. Y.; Casida, J. E. Stereospecific intramolecular cyclization for asymmetric synthesis of (Rp)- and (Sp)-enantiomers of 2-octyl and 2-phenyl-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin 2-oxides. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1995**, 102, 177–184.
- (30) Gunsalus, I. C.; Barton, L. S.; Gruber, W. Biosynthesis and structure of lipoic acid derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 1763–1766.
- (31) Fang, Z.; Liu, L.; Xu, L. L.; Yin, X. G.; Zhong, X. H. Synthesis of highly stable dihydrolipoic acid capped water-soluble CdTe nanocrystals. *Nanotechnology* **2008**, 19.
- (32) Li, J. J.; Wang, Y. A.; Guo, W. Z.; Keay, J. C.; Mishima, T. D.; Johnson, M. B.; Peng, X. G. Large-scale synthesis of nearly monodisperse CdSe/CdS core/shell nanocrystals using air-stable reagents via successive ion layer adsorption and reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12567–12575.
- (33) Blackman, B.; Battaglia, D. M.; Mishima, T. D.; Johnson, M. B.; Peng, X. G. Control of the morphology of complex semiconductor nanocrystals with a type II heterojunction, dots vs peanuts, by thermal cycling. *Chem. Mater.* **2007**, 19, 3815–3821.
- (34) Breus, V. V.; Heyes, C. D.; Nienhaus, G. U. Quenching of CdSe- ZnS core-shell quantum dot luminescence by water-soluble thiolated ligands. *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, 18589–18594.

- (35) Yu, W. W.; Qu, L. H.; Guo, W. Z.; Peng, X. G. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2854–2860.
- (36) Erker, W.; Boggasch, S.; Xie, R. G.; Grundmann, G.; Paulsen, H.; Basche, T. Assemblies of semiconductor quantum dots and lightharvesting- complex II. *J. Lumin.* **2010**, *130*, 1624–1627.
- (37) Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*, 2nd ed.; Springer: New York, 1999.
- (38) Moya, I.; Silvestri, M.; Vallon, O.; Cinque, G.; Bassi, R. Time-resolved fluorescence analysis of the photosystem II antenna proteins in detergent micelles and liposomes. *Biochemistry* **2001**, *40*, 12552–12561.
- (39) Barzda, V.; Gulbinas, V.; Kananavicius, R.; Cervinskas, V.; van Amerongen, H.; van Grondelle, R.; Valkunas, L. Singlet-singlet annihilation kinetics in aggregates and trimers of LHCII. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2409–2421.
- (40) Palacios, M. A.; Weerd, F. L.; de, Ihalainen, J. A.; van Grondelle, R.; van Amerongen, H. Superradiance and exciton (de)localization in light-harvesting complex II from green plants? *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 5782–5787.
- (41) Hildebrandt, N.; Charbonniere, L. J.; Beck, M.; Ziessel, R. F.; Lohmannsroben, H. G. Quantum dots as efficient energy acceptors in a time-resolved fluorimmunoassay. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 7612–7615.
- (42) Novoderezhkin, V. I.; Palacios, M. A.; van Amerongen, H.; van Grondelle, R. Excitation dynamics in the LHCII complex of higher plants: Modeling based on the 2.72 angstrom crystal structure. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 10493–10504.
- (43) Sauer, K.; Scheer, H.; Sauer, P. Förster transfer calculations based on crystal structure data from *Agmenellum quadruplicatum* C-phycoyanin. *Photochem. Photobiol.* **1987**, *46*, 427–440.

Supporting Information

Bio Serves Nano: Biological Light-harvesting Complex as Energy Donor for Semiconductor Quantum Dots

Mara Werwie[†], Xiangxing Xu[‡], Mathias Haase[§], Thomas Basché[§], Harald Paulsen^{*†}

[†]Institut für Allgemeine Botanik, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Johannes-von-Müllerweg 6, 55099 Mainz, Germany.

[‡]State Key Laboratory of Coordination Chemistry School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Hankou Road 22, Nanjing, CN 210093

[§]Institut für Physikalische Chemie, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Jakob-Welder-Weg 11 55099 Mainz, Germany.

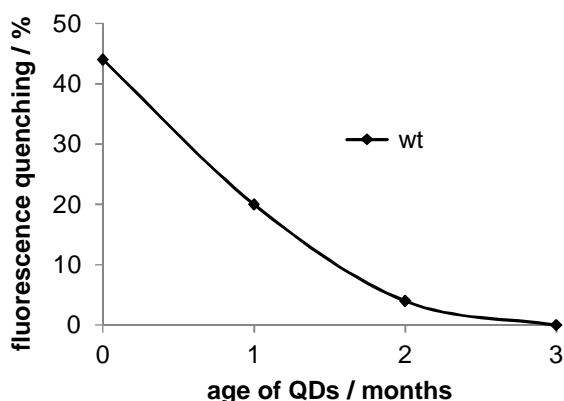


Figure S1. Dependence of LHCII (wt) fluorescence quenching on age of QDs. 15 nM LHCII was mixed with QDs at the same concentration. Fluorescence emission spectra of the samples and of pure LHCII (15 nM) were measured ($\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and the percentage of donor fluorescence quenching was calculated as described under 3.1 of Results and Discussion. Measurements were made with freshly prepared QDs and with QDs stored for 1, 2 or 3 months. Aging only applies to QDs; the LHCII samples used for these measurements were always fully intact. Different QD batches age in a similar way qualitatively although their half-lives with regard to the decrease of their fluorescence emission differ from batch to batch.

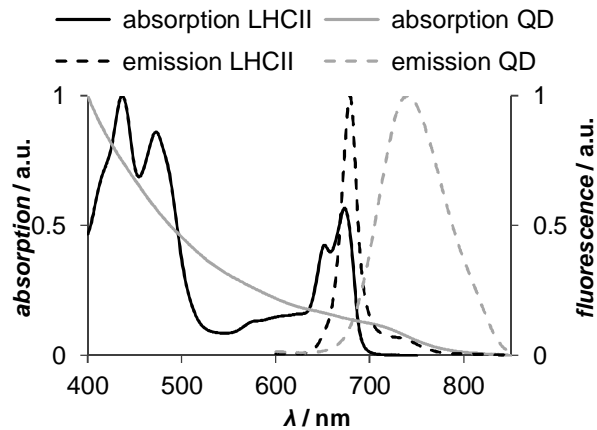


Figure S2. Spectroscopic properties of LHCII and QDs. Absorption spectra (solid lines) and emission spectra ($\lambda_{\text{ex}}=470$ nm, dashed lines) of LHCII (black) and QDs (grey) were normalized.

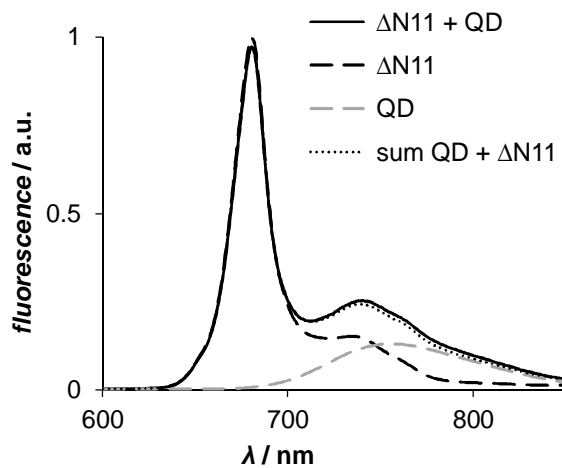


Figure S3. No LHCII-QD energy transfer in the absence of affinity tags in the LHCII protein sequence. Energy transfer measurements were performed as in Figure 1 using an LHCII mutant lacking the positive charged N-terminal domain and C-terminal His₆-tag (ΔN11). Emission spectra ($\lambda_{\text{ex}}=470$ nm) are shown of QD with (solid black line) and without LHCII (dashed grey line) and of pure LHCII (dashed black line). The dotted line represents the sum of the individual contributions. All conditions were as in Figure 1.

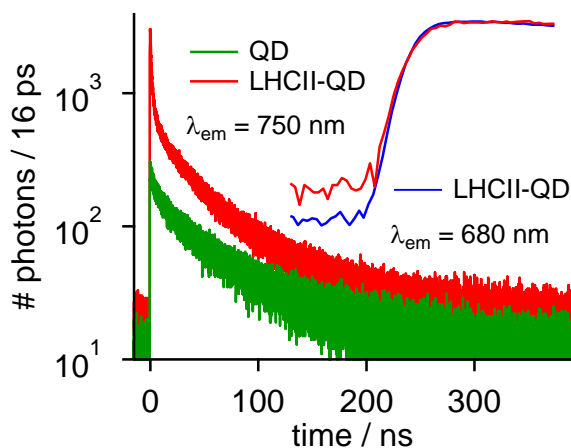


Figure S4. Fluorescence rise/decay time profiles ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) of the pure acceptor QD (green line) and LHCII-QD at $\lambda_{\text{em}} = 750 \text{ nm}$ (red line). All samples were measured in the same buffer solution and the spectral bandwidth of the emission monochromator was set to $\Delta\lambda_{\text{em}} = 14.5 \text{ nm}$. The inset shows a comparison of the rising edge of the LHCII-QD profile recorded at donor and acceptor emission, respectively. The time profiles were analyzed in terms of an iterative reconvolution fit according to Equation (2) and the individual amplitudes A_i and decay times τ_i are summarized in Table S1.

Table S1. Fluorescence decay parameters of the pure donor LHCII, the pure acceptor QD and the LHCII-QD complexes in buffer solution ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$). The emission wavelength λ_{em} was adjusted to the donor and acceptor emission, respectively, with a spectral bandwidth of the emission monochromator set to $\Delta\lambda_{\text{em}} = 14.5 \text{ nm}$. The sum of the individual amplitudes A_i is normalized to unity and $\langle\tau\rangle =$ is the *amplitude-weighted* average decay time.

	LHCII		LHCII-QD		QD
	$\lambda_{\text{em}} = 680 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{em}} = 680 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{em}} = 750 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{em}} = 750 \text{ nm}$	
$\sum_{i=1}^{n \leq 4} A_i \cdot \tau_i$					
A_1	0.89	0.84	0.13	0.37	
τ_1 [ns]	2.8	0.8	4.0	4.0	
A_2	0.11	0.15	0.1	0.34	
τ_2 [ns]	4.7	2.4	29	30	
A_3	-	0.01	0.04	0.29	
τ_3 [ns]	-	10	82	87	
A_4	-	-	0.73	-	
τ_4 [ns]	-	-	1.0	-	
$\langle\tau\rangle$ [ns]	3.0	1.1	8	37	

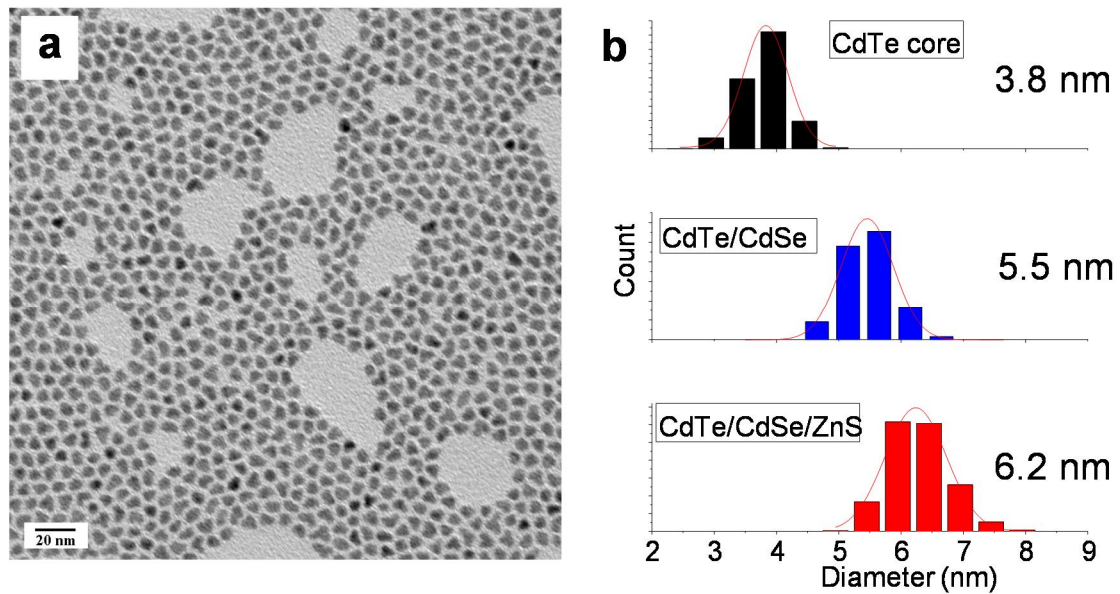


Figure S5. a) A TEM image of the CdTe/CdSe(3ML)/ZnS(1ML) QDs. For TEM imaging a droplet of the QD sample in toluene solution was added on to the carbon film supported on a copper grid. b) The size distribution estimated from the TEM images of CdTe core, CdTe/CdSe(3ML) and CdTe/CdSe(3ML)/ZnS(1ML) QDs. To estimate the average diameter, a Gaussian fitting curve (red line) was used.

The risetime of the sensitized QD emissions is obscured by LHCII emission.

From other experiments it is well known that the energy transfer time τ_{EET} can be directly determined from the rising edge of the time profile of the acceptor chromophore.^{44,45} Therefore, we recorded the rise/decay time profile of the LHCII-QD complexes at an emission wavelength of $\lambda_{\text{em}} = 750$ nm at which the maximum of the QD emission is located. The measured curve is shown in Figure S4 together with the rise/decay time profile of the pure QDs in buffer solution recorded under the same conditions. In both cases the fluorescence photons were recorded during the same total time of 20000 s. In contrast to the pure QDs an additional fast decay component is present in the time profile of the complex system LHCII-QD. A detailed analysis according to Equation (2) reveals three very similar decay time constants $\tau_1 - \tau_3$ for both the pure QDs and the LHCII-QD complexes (see Table S1), whereas for the latter ones a fourth decay component with a time constant of $\tau_4 = 1.0$ ns was used to sufficiently describe the decay profile which arises from residual fluorescence of the quenched LHCII at 750 nm (cf. $\langle \tau \rangle_{\text{LHCII-QD}}^{680\text{nm}} = 1.1$ ns). Since the amplitude $A_4 = 0.73$ is relatively large, the rising part of the time profile is predominantly determined by direct excitation of the LHCII which is visualized in the inset of Figure S4 comparing the rising edge of the LHCII-QD time profile at 750 nm (red line) and at 680 nm (blue line). Therefore, no additional rise time component (τ_{EET}) due to electronic energy transfer could be revealed. However, this observation does not rule out sensitized acceptor

emission due to energy transfer since it can be explained by the simultaneous excitation at 470 nm of both the LHCII trimers and QDs.

References

(44) Hinze, G., Haase, M., Nolde, F., Mullen, K., Basché, T. Time-resolved measurements of intramolecular energy transfer in single donor/acceptor dyads. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 6725–6729.

(45) Roth, P. J., Haase, M., Basché, T., Theato, P., Zentel, R. Synthesis of heterotelechelic alpha,omega dye-functionalized polymer by the RAFT process and energy transfer between the end groups. *Macromolecules* **2010**, *43*, 895–902.

3.5.2 FRET - Ein Vergleich von DHLA-QDs und MPA-QDs

Als Liganden zur Wasserlöslichkeit der verschiedenen QDs wurde überwiegend Dihydroliponsäure (DHLA), aber vereinzelt auch Mercaptopropionsäure (MPA) (vgl. 3.2.2) verwendet. Bei MPA handelt es sich wie z.B. auch bei D-Penicillamin um einen einzähligen Liganden, dessen aliphatische Seitenkette deutlich kürzer ist als die von DHLA. Die Untersuchung des Energietransfers in Hybridkomplexen aus CdTe/3xCdSe/ZnS/MPA-QDs und LHCII zeigte auch hier, dass die Fluoreszenzlöschung des LHCII stets mit der sensibilisierten Akzeptorfluoreszenz des QD korrelierte (Daten nicht gezeigt). Da die Nanopartikel der folgenden Versuche mit den beiden Liganden aus der gleichen Charge stammen (sozusagen identisch sind), war es möglich, Unterschiede in der Energietransfereffizienz zwischen dem LHCII und den Typ-II QDs auf die Unterschiede der Liganden zurückzuführen.

Um den Energietransfer zwischen den C3.2h-Trimeren und den MPA-QDs bzw. DHLA-QDs vergleichen zu können, wurden konstante Mengen an C3.2h-Trimeren (15 nM) mit verschiedenen Konzentrationen an MPA- bzw. DHLA-QDs gemischt. Dabei wurden QD-Trimer-Verhältnisse von 0,5, 1, 2 und 3 (MPA-QDs) bzw. 5 (DHLA-QDs) angesetzt und Emissionsspektren nach einer Anregung von 470 nm aufgenommen. Anhand des Emissionsspektrums einer gleichkonzentrierten C3.2h-Referenz konnte die Löschung der Donor-Fluoreszenz (=LHCII) ermittelt werden und gegen das QD-LHCII-Verhältnis aufgetragen werden (Abb. 3.22). Sowohl mit DHLA- als auch mit MPA-QDs konnte mit steigendem QD-LHCII-Verhältnis eine Steigerung der Donorfluoreszenzlöschung beobachtet werden. Außerdem deutete sich in beiden Fällen eine Sättigung der Fluoreszenzlöschung ab einem QD-LHCII-Verhältnis von 2 an. Die maximale Fluoreszenzlöschung der C3.2h-Trimere mit MPA-QDs lag bei ca. 75% und damit um ganze 10-Prozentpunkte höher als in Hybridkomplexen mit DHLA-QDs (65%).

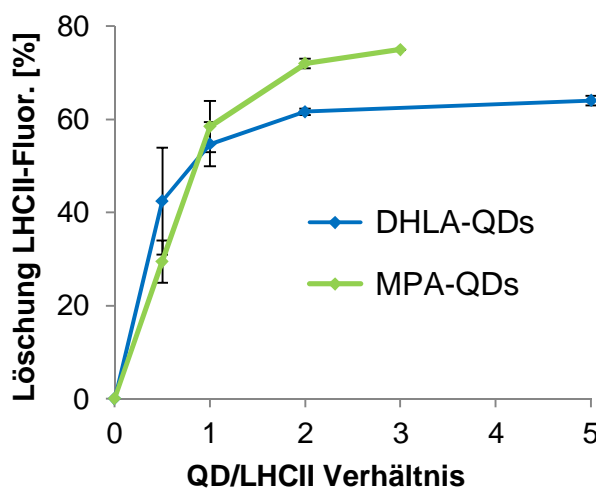


Abb. 3.22 Löscherung der LHCII-Fluoreszenz in Abhängigkeit vom QD-Liganden. Jeweils 45 nM C3.2h wurde mit verschiedenen Konzentrationen an MPA-QDs bzw. DHLA-QDs gemischt (QD/LHCII (Trimer)-Verhältnisse 0, 0,5, 1, 2 und 3 (bzw. 5), 90 min auf Eis inkubiert und Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen. Nach der Dekonvolution der Spektren wurde die anteilige LHCII-Fluoreszenz mit der Ausgangsfluoreszenz der reinen LHCII-Probe verglichen, die prozentuale Löscherung ermittelt und gegen das QD-LHCII-Verhältnis aufgetragen. Graue Balken: Standardabweichungen von zwei Messungen (Verhältnis 3 für MPA-QDs nur einfach gemessen).

3.5.3 FRET zwischen LHCII-Cysteinmutanten und Typ-II QDs

Aufgrund der Tatsache, dass viele Liganden über Thiolgruppen an die ZnS-Oberfläche von QDs binden, war die Überlegung, dass auch die Bindung des LHCII an die QD-Oberfläche über solche Thiolgruppen erreicht werden könnte. Aus diesem Grunde wurden verschiedene zu diesem Zeitpunkt verfügbare Cysteinmutanten ausgewählt und jeweils 15 nM der Trimere mit einem zweifachen Überschuss an QDs versetzt. Neben der Einfachcysteinmutante S3Ch (ein Cystein an Position 3, stromal) und den Zweifachcysteinmutanten S3/160Ch (Cystein an Position 3 und 160, beide stromal) und S106/160Ch (Cystein an Position 106 (lumenal) und 160 (stromal)) wurde mit dem C3.2h (=Kontrolle) eine Mutante verwendet, die über kein Cystein in den möglichen Bindedomänen verfügt. Nach der Inkubation auf Eis wurden Absorptionsspektren und Exzitationsspektren der Proben sowie einer reinen gleichkonzentrierten QD-Probe aufgenommen (Abb. 3.23).

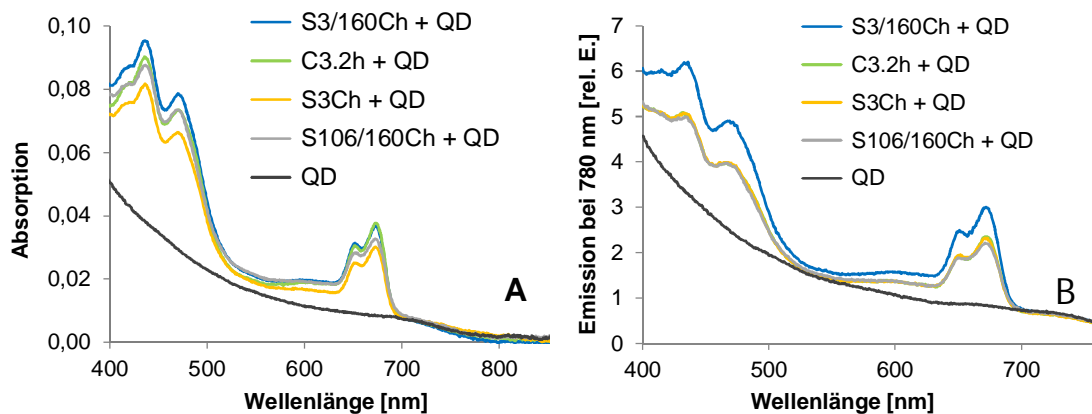


Abb. 3.23 Untersuchung des Energietransfers zwischen LHCII-Cysteinmutanten und DHLA-QDs. 15 nM verschiedener LHCII-Trimere wurden jeweils mit 30 nM QDs vermischt und nach 90 min auf Eis spektroskopisch vermessen. Außerdem wurden entsprechende Spektren einer 30 nM QD-Lösung ohne LHCII aufgenommen (dunkelgrau). Verwendete LHCII-Mutanten: S3/160Ch (blau), C3.2h (grün), S3Ch (gelb), S106/160Ch (hellgrau). A: Absorptionsspektren. B: Exzitationsspektren ($\lambda_{em} = 780$ nm).

Der Vergleich der Absorptionsspektren zeigt, dass in der Probe mit der Cysteinmutante S3Ch die LHCII-Trimere etwas geringer konzentriert sind als in den anderen Proben. Die Emission der Anregungsspektren wurde bei 780 nm detektiert, also nahe dem Emissionsmaximum der QDs. Den Spektren ist deutlich zu entnehmen, dass die QDs aus Hybridkomplexen mit dem S3/160Ch mehr Energie des LHCII für sich nutzen können als in den anderen Hybridkomplexen. Besonders augenscheinlich wird dies, wenn man die Hybridkomplexe des C3.2h mit denen des S3/160Ch vergleicht. Die Proben weisen nahezu identische Absorptionsspektren im Q_y -Bereich auf, während das Exzitationsspektrum des C3.2h-Komplexes eine deutlich schwächere Sensibilisierung der QD-Fluoreszenz in diesem Bereich zeigt. Eine LHCII-Variante mit einer N-terminalen Deletion von 11 AS und Einfügung von zwei Cysteinen an der Position 34 und 160 ($\Delta N11/S34/S160C$) zeigt keinerlei Energietransfer auf die QDs (Daten nicht gezeigt).

An dieser Stelle soll auf Ergebnisse hingewiesen werden, die im Zusammenhang mit der Herstellung von Triaden aus Farbstoff, LHCII und QDs erzielt wurden (siehe auch 3.6). Hier wurde das Apoprotein des S3/160Ch mit Farbstoff markiert und anschließend nach Standardverfahren Trimere hergestellt. 15 nM dieser Trimere wurden ebenso wie entsprechende unmarkierte Trimere mit QDs in einem 1 zu 1 Verhältnis gemischt und nach einer Inkubation auf Eis Absorptions- und Anregungsspektren aufgenommen; ebenso wurde mit der Referenzprobe (15 nM QDs) verfahren (Abb. 3.24).

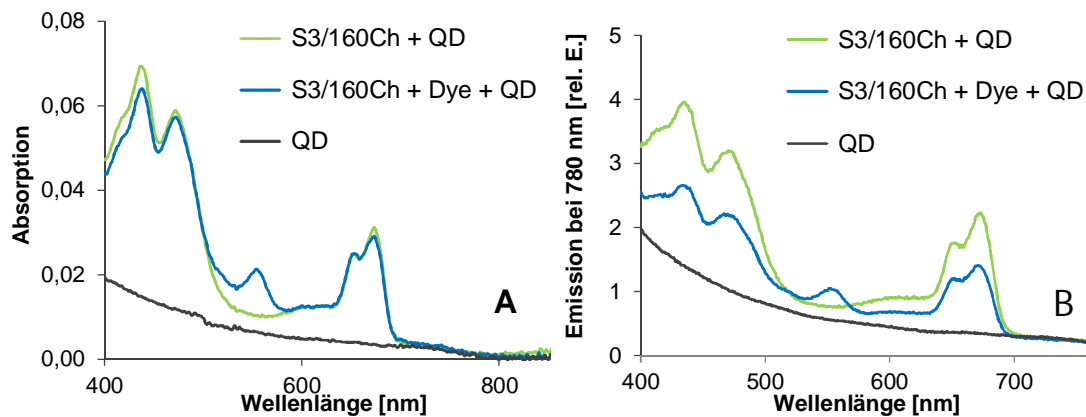


Abb. 3.24 Einfluss einer Markierung der Cysteine an Position 3 und 160 im LHCII auf den Energietransfer zwischen LHCII und QDs. 15 nM farbstoffmarkierter (blau) und unmarkierter (grün) S3/160Ch-Trimere wurden jeweils mit 15 nM QDs vermischt und nach 90 min auf Eis spektroskopisch vermessen. Außerdem wurden entsprechende Spektren einer 15 nM QD-Lösung ohne LHCII aufgenommen (grau). A: Absorptionsspektren. B: Exzitationsspektren ($\lambda_{em} = 780$ nm).

Die Absorptionsspektren der Proben zeigen, dass die LHCII- sowie die QD-Konzentrationen in den markierten und den unmarkierten LHCII-QD-Hybridkomplexen vergleichbar sind. Außerdem lässt sich gut erkennen, dass die farbstoffmarkierten Hybridkomplexe (blau) im Vergleich zu den unmarkierten Hybridkomplexen (grün) über einen zusätzlichen Absorptionspeak bei ca. 550 nm verfügen, der auf die Anwesenheit des an den LHCII gebundenen Farbstoffes in diesen Proben zurückzuführen ist. Die entsprechenden Anregungsspektren mit einer Emissionsdetektion nahe des QD-maximums (780 nm) zeigen deutlich, dass die QDs in der Triade weniger Energie des LHCII für sich nutzen können als die QDs in der Dyade ohne Farbstoff. Der Vergleich der Verläufe beider Exzitationsspektren mit dem reiner QD-Proben zeigt, dass die Quantenausbeute der QDs von der Bindung des Farbstoffes unbeeinflusst bleibt.

Die vorangehenden Ergebnisse haben dazu motiviert, eine LHCII-Variante mit einem Tetracystein-Motiv herzustellen, in der Hoffnung, eine weitere Proteinbindesequenz mit einer hohen Affinität zu QDs, die eine ZnS-Hülle besitzen, zu erhalten (siehe 3.5.4).

- 3.5.4 Vergleich von Quantum Dot bindenden Proteinsequenzen -
Untersuchung der Affinität mit Hilfe von Ultrazentrifugation und FRET.
Publikation II: Comparison of Quantum Dot-binding Protein Tags -
Affinity Determination by Ultracentrifugation and FRET [in Bearbeitung]**

Comparison of Quantum Dot-binding Protein Tags:
Affinity Determination
by Ultracentrifugation and FRET

*Mara Werwie[†], Niklas Fehr[†], Kristina Gundlach[†], Anita Bohlender[†], Xiangxing Xu[‡], Thomas
Basché[§], Harald Paulsen^{*†}*

[†]Institut für Allgemeine Botanik, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Johannes-von-Müllerweg 6, 55099 Mainz, Germany.

[‡]State Key Laboratory of Coordination Chemistry School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Hankou Road 22, Nanjing, CN 210093

[§]Institut für Physikalische Chemie, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Jakob-Welder-Weg 11 55099 Mainz, Germany. Email: basche@uni-mainz.de

Abstract

In this paper we characterize the interaction between a recombinant chlorophyll binding protein and CdTe/CdSe/ZnS QDs by using ultracentrifugation and Förster resonance energy transfer (FRET) assay experiments. Ultracentrifugation was used as a fast method to compare the binding strength between different protein tags and the QDs. Furthermore the light harvesting-complex (LHCII) to QD stoichiometry was determined by the separation of the protein-QD hybrid complexes from free protein via ultracentrifugation through a sucrose cushion. One trimeric LHCII was found to be bound to the QD surface. Binding constants of the different protein derivatives were evaluated by FRET assays. A new tetra cysteine motive interacted strongly ($K_a = 4.9 \pm 1.9 \text{ nM}^{-1}$) with the nanoparticles compared to a hexahistidine tag (His₆ tag) ($K_a \sim 1 \text{ nM}^{-1}$). The combination of rapid centrifugation and fluorescence-monitored titration will be useful to assess the binding strength between QDs and a broad range of proteins..

1. Introduction

Semiconductor quantum dots (QDs) are widely used for biological labeling applications.¹⁻³ The advantages of QDs include their high photo-stability and their tuneable, size dependent absorption and fluorescence emission bands. Their strong fluorescence makes them excellent candidates for Förster resonance energy transfer (FRET) for example with fluorescent dye-labeled biomaterials.⁴⁻⁶ As a further advantage, QD-protein (or peptide) conjugates often form spontaneously. Several strategies have been described for this self-assembly. Poly histidine tags chelate metal ions on the surface of ZnS-coated core/shell QDs.⁷⁻¹¹ A strong affinity to the ZnS surface was also observed with peptides containing multiple repeats of cysteine pairs.¹² Furthermore, electrostatic interactions formed between charged ligands on QD surfaces and protein domains^{13,14} or membrane surfaces¹⁵ carrying the opposite charges have been described.

If QDs are to be used as protein labels, it is helpful to know the QD-protein stoichiometry or to establish strategies to produce hybrid complexes at defined ratios. Gel electrophoresis has been used to separate hybrid complexes from QDs and polyhistidine-tagged proteins at well-defined stoichiometries.¹⁰ This method has also been used in combination with Western blotting, to approximate the average packing densities of antibody conjugated QDs.¹⁶ Studies of protein-QD hybrid complexes by analytical ultracentrifugation show that the QD protein interaction can be monitored by this method and rough approximations about the complex's stoichiometry can be made.¹⁷ Atomic Force Microscopy was used to demonstrate a 1:1 formation of protein-QD assemblies.¹⁸ All methods have in common that they are very complex and/or can give only a rough estimation of the QD-protein stoichiometry.

Here we present a very simple and fast method to assess different binding tags for their functionality and to measure average QD-protein stoichiometries. By using fast ultracentrifugation QD-protein complexes were separated from unbound protein. FRET assays were used to estimate the binding constants of different binding tags.

In the experiments described here, water soluble CdTe/CdSe/ZnS QDs were used with dihydrolipoic acid (DHLLA) as ligand. The protein component was recombinant light harvesting complex II (LHCII), reconstituted in vitro from its bacterially expressed apoprotein and plant pigments (14 chlorophyll and 4 carotenoid molecules).¹⁹ The recombinant nature of the protein opens up the possibility of introducing different affinity tags for comparison, without altering the protein structure otherwise. The chlorophylls bound to LHCII are endogenous fluorophores that can be used to monitor protein binding to QDs by serving as acceptors of the QD excitation energy.¹⁴

2. Experimental Section

2.1. LHCII mutants

Recombinant LHCII was reconstituted from a bacterially expressed protein and plant pigments. Wild type (wt) Lhcb1*2 (AB80) from *Pisum sativum*²⁰ and its derivatives were used, one with an additional hexahistidyl (His₆) tag at the C-terminus (wt-h)²¹ and another one lacking 11 amino acids at the N-terminus (Δ N11).²² The derivatives Δ N11-h²³ and h- Δ N11 exhibit the same amino acid sequence as Δ N11 but contain a C-terminal and an N-terminal His₆ tag, respectively, whereas the LHCII derivative h- Δ N11-h contains both an N- and a C-terminal His₆ tag. The plasmids coding for h- Δ N11 and for h- Δ N11-h were constructed by using the plasmids of Δ N11 and Δ N11-h, respectively, and two primers (forward and reverse) flanking the N-terminal domain on either side. Each primer was constructed to introduce a sequence coding for three histidines so that the product of a PCR reaction with these components carried an N-terminal His₆ tag. The derivative Z8- Δ N11 also consists of the same amino acid sequence as Δ N11 but contains a ZnS specific binding tag called Z8.²⁴ The LHCII mutant 4-Cys consists of the same amino acid sequence as the wild type LHCII except of a tetra-cysteine motive (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys) between amino acids 8 and 9. Both the Z8 and the 4-Cys were produced with the same strategy as described for h- Δ N11 and h- Δ N11-h.

2.2. Preparation of recombinant LHCII trimers

The proteins were expressed in *Escherichia coli* as described earlier.²² Total pigment extract, chlorophylls *a* and *b*, and carotenoids were isolated from pea thylakoids.²⁵ LHCII apoproteins were reconstituted with pigments to form monomeric LHCII by the detergent exchange method¹⁹ and trimerization was carried out by affinity chromatography for His₆ tag-containing

LHCII versions²⁶ or by trimerization in liposomes according to²³ for LHCII versions without His₆ tag.

For separating monomers and trimers and for removing unbound pigments and unfolded protein, the reconstituted complexes were ultracentrifuged through a sucrose density gradient as described earlier²⁷ but with a modified buffer (50 mM sodium-phosphate, pH 8.5, 0.1 % (w/v) dodecyl-maltoside, 0.6 M sucrose). The trimer band was extracted from the sucrose gradient after centrifugation and its spectroscopic properties were checked by absorption, fluorescence, and CD measurements.²² The recombinant LHCII complexes contained per 2 lutein molecules about 14 chlorophylls, one neoxanthin and substoichiometric amounts of violaxanthin.²⁸

2.3. Synthesis of water-soluble CdTe/CdSe/ZnS quantum dots

Water-soluble CdTe/CdSe/ZnS quantum dots were synthesized as described elsewhere.²³

2.4. Assembly of LHCII and type-II QDs

For titrating LHCII binding to QD, both components were mixed on ice with tris-(2-carboxyethyl) phosphine (2 mM) and buffer (50 mM sodium-phosphate, pH 8.5, 0.1 % (w/v) dodecyl- maltoside, 0.6 M sucrose) to a final volume of 50 μ l (centrifugation experiments) or 500 μ l (FRET experiments). The QD concentration was kept constant at 0.2 μ M (centrifugation experiments) or at 15 nM (FRET experiments) whereas the concentration of the LHCII trimer varied to arrive at molar ratios between 0.5 and 5. The mixtures were incubated for 90 minutes on ice.

2.5. Ultracentrifugation experiments

Ultracentrifugation experiments have been carried out with a Beckmann Airfuge (rotor: A-110, Beckmann Instruments, Munich). After incubation for 90 minutes on ice the LHCII-QD samples (see 2.4) were put on a 130 μ l sucrose cushion (1 M sucrose, 50 mM sodium-phosphate, pH 8.5, 0.1 % (w/v) dodecyl-maltoside) and centrifuged at 190,000 g for 20 min at RT. Then 50 μ l of the bottom fraction (with the LHCII-QD pellet) and subsequently 130 μ l of the supernatant above the cushion (only LHCII) were made up to a final volume of 500 μ l in the same buffer containing TCaEP (final concentration of 2 mM). The samples were sonified for 3 min to suspend the LHCII-QD pellet completely. For determining the LHCII amounts in each sample absorption spectra were recorded.

2.6. Spectroscopic characterization of type-II QDs, LHCII and hybrid complexes.

UV-Vis absorption spectra were measured at RT by using an Omega-20 spectrometer (Bruins Instruments) or a V550 UV-Vis spectrophotometer (Jasco, Germany). The concentration of LHCII was determined by using an extinction coefficient of $\epsilon(670 \text{ nm}) = 1,638,000 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$.²⁹

Photoluminescence (PL) spectra were recorded with a Fluoromax-2 spectrometer (Jobin Yvon, Germany). Spectra were corrected for the wavelength-dependent sensitivity of the fluorometer. The QD fluorescence quantum yields were estimated by comparing their fluorescence intensity with that of LHCII solutions possessing the same optical density at the excitation wavelength. The LHCII fluorescence quantum yield was determined to be 0.2 as described earlier.²⁸ For energy transfer calculations, emission spectra of LHCII-QD adducts were expressed as sums of the emission spectra of LHCII and QD alone, and the spectral contributions were integrated.

3. Results and Discussion

3.1. Ultracentrifugation experiments can be used to compare the binding strength of QD-binding protein tags

For comparing the affinities of different protein binding tags, several LHCII variants were created and mixed with QDs. In this work, CdSe/CdTe/ZnS core-shell QDs coated with dihydrolipoic acid (DHLLA) were used. Wild type LHCII binds to QDs via electrostatic interactions between a cluster of positive charges in the protein's N-terminal domain and the negative charges of the DHLLA coating on the QD surface. Additionally it has been shown that a C-terminally introduced His₆ tag interacts with exposed Zn²⁺ ions on the surface. An LHCII mutant lacking the positive charges and containing no additional His₆ tag showed no interaction with the nanoparticles.^{14,23} In the present work, two additional QD-binding protein tags were tested and compared to the His₆ tag and the positive-charge cluster. The Z8 peptide sequence, which was described to bind to ZnS surfaces with a relatively high affinity,³⁰ was N-terminally attached to an LHCII version lacking the positive charges in this domain. Furthermore, an LHCII version was created with a tetra-cysteine motive (CCPGCC) within in the N-terminal domain. Numerous different ligands have been bound to the ZnS surface of QDs via their sulfhydryl groups,^{31,32} including the DHLLA coating of QDs used in the present work.³³

Relative affinities to QDs of the various binding tags were assessed by a rapid ultracentrifugation assay. Mixtures of 0.3 μM QDs and 0.2 μM LHCII trimers were incubated for 90 min to ensure that the binding equilibrium was reached. In this work LHCII trimers have been used throughout and therefore will be designated as LHCII for simplicity. Time resolved measurements of the energy transfer from LHCII to QD at RT revealed that most of the complexes formed within seconds and after 10-12 min the reaction completed (data not shown). The QDs with their LHCII ligands bound were then centrifuged at 190,000 g through a sucrose cushion and, thus, separated from unbound LHCII which stayed on top of the sucrose cushion (see 2.5). Both the QD pellet and the supernatant were analyzed for their LHCII content as quantitated by measuring chlorophyll absorption. Assays were evaluated only if at least 80 % of the total LHCII amount applied was retrieved. **Fig. 1** gives the percentages of total LHCII found

in the pellet. In the mutant $\Delta N11$ the wild type's cluster of positive charges in N-terminal domain has been deleted. Containing no QD affinity tag, $\Delta N11$ was used as a negative control and, as expected, did not appear in the QD pellet. Of the wild type LHCII (wt) 40 % was found in the pellet after centrifugation, whereas around 60 % of the LHCII mutants containing one His₆ tag at the C- ($\Delta N11$ -h) or at the N-terminus (h- $\Delta N11$) were bound to QDs, indicating that the His₆-tag mediated binding occurs with higher affinities in comparison to the electrostatic interactions. Both His₆-tagged mutants carry the same deletion in the N-terminal domain as described for $\Delta N11$, thus they do not interact with the negatively charged DHLA. This is also true for the LHCII version Z8- $\Delta N11$, which carries a ZnS affinity tag, but only binds at a very low level (4 %) in comparison to the other LHCII mutants with binding tags. Of the LHCII mutant containing the tetra-cysteine-motive in the N-terminus (4-Cys) 70 % was found in the pellet after centrifugation with the QDs. Thus the affinity of the tetra-serine motif to the ZnS surface of the QDs appears to be higher than that of the His₆ tag. In contrast to the LHCII versions listed before, wt-h and h- $\Delta N11$ -h contain two binding tags, one at each end of the protein. Wt-h is a derivative of the wild type carrying a His₆-tag at the C-terminus and containing its native N-proximal positive-charge cluster. With 60 % found in the pellet this version appears to bind more efficiently compared to wt is comparable to $\Delta N11$ -h. If the h- $\Delta N11$ -h was used in this centrifugation experiments, 85 % of the protein was bound to the QDs. The pellet of these hybrid complexes was difficult to re-solubilize, thus the amount of bound LHCII was calculated from the LHCII found in the supernatant fraction. It should be noted that h- $\Delta N11$ -h as well as wt-h contain two affinity tags and thus, are able to interact with two QDs per LHCII.

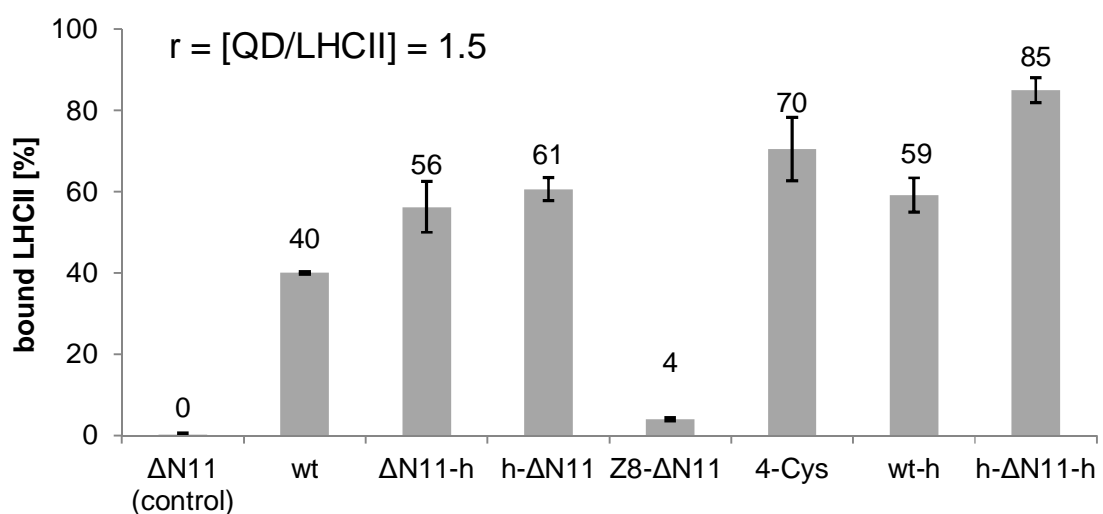


Figure 1. Binding experiments for testing interactions between QD and different LHCII mutants. QDs (0.3 μ M) were mixed with different LHCII mutants (0.2 μ M) and were centrifuged through a 1 M sucrose cushion. The amount of bound LHCII was calculated by absorption measurements except h- $\Delta N11$ -h where the LHCII amount in the supernatant was quantitated.

3.2. Ultracentrifugation experiments suitable for estimation of LHCII-QD stoichiometry

For estimating the maximum amount of LHCII-trimers that can be bound to the surface of the nanoparticles, QDs at a constant concentration (0.2 μM) were incubated with increasing amounts of LHCII. The LHCII version h- ΔN11 was used, carrying a single affinity tag. The LHCII to QD ratios were varied between 0 (no LHCII), 0.5, 1, 2, 4, 6 and 10. The samples were centrifuged through a sucrose cushion and the amounts of bound and unbound LHCII in the pellet and the supernatant fractions, respectively, were quantitated. When the pellet fraction was removed, some carry-over of material in the supernatant could not be avoided. To take this into account, control experiments were performed for each LHCII concentration in which the QDs were omitted. In these samples, there was no pellet, and the amount of LHCII collected after taking out the bottom fraction was taken to be the carry-over. This amount of LHCII was subtracted from the one in the pellet fractions of the samples containing QDs. The subtraction amounted to approximately 10 % of what was found in the pellet.

Up to four-fold excess of LHCII over QD the amount of LHCII in the pellet increased but reached saturation at a six-fold excess (**figure 2**). The amount of LHCII bound per QD never exceeded 1 even at a 10-fold excess of LHCII.

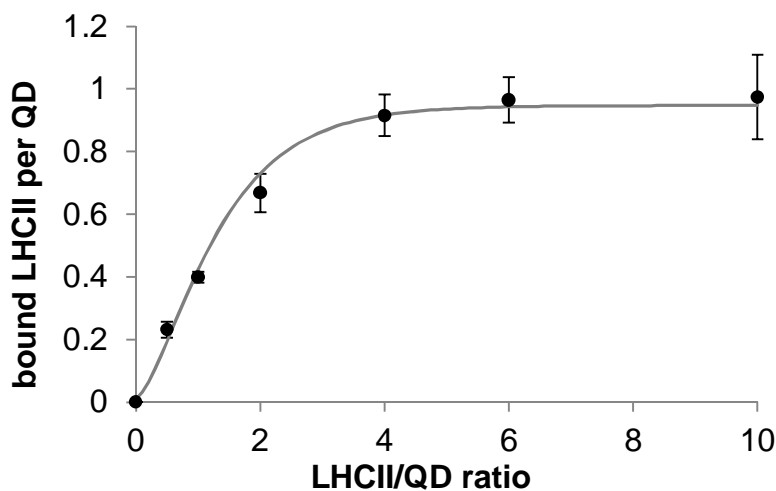


Figure 2. Estimation of the maximum amount of LHCII trimers (h- ΔN11) bound per QD. A constant concentration of QDs (0.2 μM) has been mixed with different concentrations of LHCII-trimers (h- ΔN11) and was centrifuged over a 1 M sucrose cushion. The amount of bound LHCII (pellet fraction) was calculated by absorption measurements. Data have been corrected by the ‘carry-over fault’ (see text for details). Average (black points) and standard deviation (black bar) are given of three independent measurements. A fitted binding curve (grey line) has been calculated by using the formula $y^{-0.5} = a + be^{-x}$.

This result is consistent with our previous study using the same type of LHCII-QD hybrid complexes.²³ In that study the energy transfer from LHCII to QD indicated that one LHCII per QD bound with high affinity (association constant $K_a \sim 3\text{nM}^{-1}$). If the excess amount of LHCII over QD was further increased, the energy transfer rose slightly, indicating that a second LHCII can bind, albeit at a much lower affinity. In the present ultracentrifugation experiments, the

stoichiometry of LHCII binding to QD is restricted to 1. This may be explained by the lower binding strength of a second LHCII per QD causing this second LHCII to dissociate from its QD before it co-sediments through the sucrose cushion.

3.3. Binding constants of protein-QD hybrid complexes estimated by FRET assays

To estimate an apparent binding constant of the different LHCII-QD hybrid complexes the percentage of QD-bound LHCII was calculated by comparing the donor quenching of LHCII in a 1:1 mixture with QDs to its maximal quenching at saturation amounts of QDs. This was performed with two different LHCII concentrations: 15 nM and 1.5 nM. The binding constant was then determined by the following equation

$$K_a [M^{-1}] = \frac{[QD - LHCII]}{[QD][LHCII]} \quad (1)$$

As expected, no FRET was found in the control measurements with $\Delta N11$ and nanoparticles.²³ Without any binding tags the LHCII does not interact with the QDs and thus cannot transfer its excitation energy to the QDs. The FRET assays yield a binding constant of $0.18 \pm 0.10 \text{ nM}^{-1}$ for wt-QD hybrid complexes binding via the protein's N-proximal cluster of positive charges (**table 1**). In comparison the K_a values were significantly higher for hybrid complexes with LHCII mutants carrying a single his tag, either on the N or the C terminus ($K_a (\Delta N11-h) = 0.81 \pm 0.21 \text{ nM}^{-1}$; $K_a (h-\Delta N11) = 2.22 \pm 1.03 \text{ nM}^{-1}$). These values match within their error margins. If the error is over-estimated and the N-terminal his tag binds more strongly, this may be explained by the higher flexibility of the N compared to the C terminus³⁴ facilitating its contact with the QD surface. The LHCII version Z8- $\Delta N11$ with its ZnS-specific affinity sequence was only slightly quenched upon exposure to QDs. Its K_a value ($K_a = 0.08 \pm 0.05$) is even smaller than that of wt. This is unexpected as the Z8 tag has been designed by directed evolution to bind tightly to ZnS surfaces. The data obtained here suggest that the Z8 tag does not interact with the ZnS surface of the QD. More likely it binds via two positive charges (two neighboring arginines) in the Z8 sequence to the negative charges of the DHLA. Wt exhibits a cluster of five positive charges¹⁴ at the N terminus, thus it is expected that the K_a value of Z8- $\Delta N11$ is smaller compared to that of wt. The tetra cysteine motive (4-Cys) has the highest affinity to the QDs. The calculated binding constant from FRET-experiments was $4.90 \pm 1.94 \text{ nM}^{-1}$. To our knowledge this is the highest binding constant which has been described for hybrid complexes of ZnS coated QDs and proteins.

For the LHCII versions wt-h and h- $\Delta N11$ -h the calculation of binding constants is less straight-forward because of the presence of two binding tags. However, as expected, the combination of two His tags (h- $\Delta N11$ -h, $K_a = 4.58 \pm 1.84 \text{ nM}^{-1}$) or a combination of one His tag

and a tag binding electrostatically (wt-h, $K_a = 1.77 \pm 0.52 \text{ nM}^{-1}$) result in a higher apparent affinity to QDs than a single his tag ($\Delta\text{N11-h}$, $K_a = 0.81 \pm 0.21$).

Table 1: The calculated binding constants with standard deviations of different LHCII-QD hybrid complexes from FRET assay experiments.

LHCII mutant	K_a [nM^{-1}]
ΔN11	0.00
wt	0.18 ± 0.10
$\Delta\text{N11-h}$	0.81 ± 0.21
h- ΔN11	2.22 ± 1.03
Cys ₄ -wt	4.90 ± 1.94
Z8- ΔN11	0.08 ± 0.05

The binding constants of protein-QD hybrid complexes promoted by a single his tag in the protein sequence are consistent with data in the literature ($K_a \approx 1 \text{ nM}^{-1}$).¹¹ In principle, the centrifugation experiments should also be suitable for determining binding constants. However, the data of these experiments are inconsistent in this case. At the high concentration of reactants used in these experiments the binding should be close to 100 %. Interestingly, the amounts of the different LHCII versions co-sedimenting with QDs correlate well with the relative binding strengths. A possible explanation is that during sedimentation it is actually dissociation kinetics that are measured. The lower the binding strength, the faster LHCII dissociates from QD when the complexes are taken out of their equilibrium during their passage through the sucrose gradient. Consequently, less LHCII is found in the pellet. Therefore, although ultracentrifugation cannot be applied to actually measure binding constants, it recommends itself as a very rapid technique not only for checking whether a protein (or some other ligand) binds to QDs at all but also for comparing different ligands with regard to their relative binding strengths.

4. Conclusions

In this study, various protein tags were compared with regard to their affinity to core-shell quantum dots with a ZnS surface coated with DHLA. A tetra-cysteine tag (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys) bound significantly more tightly than the often-employed His tag. Binding constants were measured by using energy transfer from QDs to the protein as a monitor for complex formation. Rapid ultracentrifugation through a sucrose cushion is introduced as a new technique for quickly testing whether a protein binds at all to QDs and even for comparing binding strengths of different affinity sequences semi-quantitatively. Both techniques can be extended to

a vast range of membrane proteins or water-soluble proteins and even to other QD-binding ligands, provided they are fluorescent, either endogenously or by fluorescent labeling.

Acknowledgements

This work has been funded by DFG (SFB 625, TP B7, to T.B. and H.P.) and in its initial part by Stiftung Volkswagenwerk (I/82072, to T.B. and H.P.).

References

- (1) Algar, W. R., Tavares, A. J., Krull, U. J. Beyond labels: A review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *673*, 1–25.
- (2) Shao, L., Gao, Y., Yan, F. Semiconductor Quantum Dots for Biomedical Applications. *Sensors* **2011**, *11*, 11736–11751.
- (3) Mattoussi, H., Palui, G., Na, H. B. Luminescent quantum dots as platforms for probing in vitro and in vivo biological processes. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 138–166.
- (4) Algar, W. R., Krull, U. J. Quantum dots as donors in fluorescence resonance energy transfer for the bioanalysis of nucleic acids, proteins, and other biological molecules. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1609–1618.
- (5) Rogach, A. L. Fluorescence energy transfer in hybrid structures of semiconductor nanocrystals. *Nano Today* **2011**, *6*, 355–365.
- (6) Boeneman, K., Delehanty, J. B., Susumu, K., Stewart, M. H., Deschamps, J. R., Medintz, I. L. Quantum dots and fluorescent protein FRET-based biosensors. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2012**, *733*, 63–74.
- (7) Medintz, I. L., Clapp, A. R., Mattoussi, H., Goldman, E. R., Fisher, B., Mauro, J. M. Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors. *Nat. mater.* **2003**, *2*, 630–638.
- (8) Sapsford, K. E., Pons, T., Medintz, I. L., Higashiya, S., Brunel, F. M., Dawson, P. E., Mattoussi, H. Kinetics of metal-affinity driven self-assembly between proteins or peptides and CdSe-ZnS quantum dots. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 11528–11538.
- (9) Dennis, A. M., Bao, G. Quantum dot-fluorescent protein pairs as novel fluorescence resonance energy transfer probes. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 1439–1445.
- (10) Dif, A., Boulmedais, F., Pinot, M., Roullier, V., Baudy-Floc'h, M., Coquelle, F. M., Clarke, S., Neveu, P., Vignaux, F., Le Borgne, R., Dahan, M., Gueroui, Z., Marchi-Artzner, V. Small and Stable Peptidic PEGylated Quantum Dots to Target Polyhistidine-Tagged Proteins with Controlled Stoichiometry. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14738–14746.
- (11) Zhang, Y., Zhang, H. Y., Hollins, J., Webb, M. E., Zhou, D. J. Small-molecule ligands strongly affect the Forster resonance energy transfer between a quantum dot and a fluorescent protein. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 19427–19436.
- (12) Pinaud, F., King, D., Moore, H. P., Weiss, S. Bioactivation and cell targeting of semiconductor CdSe/ZnS nanocrystals with phytochelatin-related peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6115–6123.

- (13) Mattoussi, H., Mauro, J. M., Goldman, E. R., Anderson, G. P., Sundar, V. C., Mikulec, F. V., Bawendi, M. G. Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12142–12150.
- (14) Erker, W., Boggasch, S., Xie, R. G., Grundmann, G., Paulsen, H., Basche, T. Assemblies of semiconductor quantum dots and light-harvesting-complex II. *J. Lumin.* **2010**, *130*, 1624–1627.
- (15) Bouchonville, N., Molinari, M., Sukhanova, A., Artemyev, M., Oleinikov, V. A., Troyon, M., Nabiev, I. Charge-controlled assembling of bacteriorhodopsin and semiconductor quantum dots for fluorescence resonance energy transfer-based nanophotonic applications. *Appl. Phys. Lett.* **2011**, *98*.
- (16) Pathak, S., Davidson, M. C., Silva, G. A. Characterization of the Functional Binding Properties of Antibody Conjugated Quantum Dots. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1839–1845.
- (17) Lees, E. E., Gunzburg, M. J., Nguyen, T. L., Howlett, G. J., Rothacker, J., Nice, E. C., Clayton, A. H., Mulvaney, P. Experimental determination of quantum dot size distributions, ligand packing densities, and bioconjugation using analytical ultracentrifugation. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 2883–2890.
- (18) Wang, H., Tessmer, I., Croteau, D. L., Erie, D. A., van Houten, B. Functional characterization and atomic force microscopy of a DNA repair protein conjugated to a quantum dot. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 1631–1637.
- (19) Paulsen, H., Finkenzeller, B., Kühlein, N. Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *215*, 809–816.
- (20) Cashmore, A. R. Structure and expression of a pea nuclear gene encoding a light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1984**, *81*, 2960–2964.
- (21) Kosemund, K., Geiger, I., Paulsen, H. Insertion of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein into the thylakoid - Topographical studies. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1138–1145.
- (22) Paulsen, H., Rümmler, U., Rüdiger, W. Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein overexpressed in *E. coli*. *Planta* **1990**, *181*, 204–211.
- (23) Werwie, M., Xu, X., Haase, M., Basche, T., Paulsen, H. Bio serves nano: biological light-harvesting complex as energy donor for semiconductor quantum dots. *Langmuir* **2012**, *28*.
- (24) Flynn, C. E., Mao, C. B., Hayhurst, A., Williams, J. L., Georgiou, G., Iverson, B., Am Belcher. Synthesis and organization of nanoscale II-VI semiconductor materials using evolved peptide specificity and viral capsid assembly. *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 2414–2421.
- (25) Booth, P., Paulsen, H. Assembly of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex in vitro. Time-resolved fluorescence measurements. *Biochemistry* **1996**, *35*, 5103–5108.

- (26) Yang, C., Horn, R., Paulsen, H. The light-harvesting chlorophyll *a/b* complex can be reconstituted in vitro from its completely unfolded apoprotein. *Biochemistry* **2003**, *42*, 4527–4533.
- (27) Hobe, S., Prytulla, S., Kühlbrandt, W., Paulsen, H. Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *EMBO J.* **1994**, *13*, 3423–3429.
- (28) Gundlach, K., Werwie, M., Wiegand, S., Paulsen, H. Filling the "green gap" of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex by covalent attachment of Rhodamine Red. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2009**, *1787*, 1499–1504.
- (29) Butler, P. J. G., Kühlbrandt, W. 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.* **1988**, *85*, 3797–3801.
- (30) Flynn, C. E., Mao, C., Hayhurst, A., Williams, J. L., Georgiou, G., Iverson, B., Belcher, A. M. Synthesis and organization of nanoscale II–VI semiconductor materials using evolved peptide specificity and viral capsid assembly. *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 2414–2421.
- (31) Yildiz, I., McCaughan, B., Cruickshank, S. F., Callan, J. F., Raymo, F. M. Biocompatible CdSe-ZnS Core-Shell Quantum Dots Coated with Hydrophilic Polythiols. *Langmuir* **2009**, *25*, 7090–7096.
- (32) Jana, N. R., Erathodiyil, N., Jiang, J., Ying, J. Y. Cysteine-Functionalized Polyaspartic Acid: A Polymer for Coating and Bioconjugation of Nanoparticles and Quantum Dots. *Langmuir* **2010**, *26*, 6503–6507.
- (33) Algar, W. R., Krull, U. J. Luminescence and stability of aqueous thioalkyl acid capped CdSe/ZnS quantum dots correlated to ligand ionization. *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 561–568.
- (34) Dockter, C., Muller, A. H., Dietz, C., Volkov, A., Polyhach, Y., Jeschke, G., Paulsen, H. Rigid Core and Flexible Terminus Structure of Solubilized Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Complex (LHCII) Measured by EPR. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 2915–2925.

3.5.5 Energietransfer-Effizienz zwischen Typ-II QDs und verschiedenen LHCII-Varianten

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden mehrere LHCII-Varianten ausgewählt bzw. hergestellt, die verschiedene Peptidsequenzen enthielten, mit denen sie besonders gut an die QD-Oberfläche binden sollten. Die entsprechenden apparenten Bindekonstanten dieser LHCII-Varianten wurden über Energietransfer-Messungen ermittelt (siehe 3.5.1) Um die verschiedenen LHCII-Varianten unabhängig von ihrer Affinität zu den QDs auf ihre Effizienz, mit der sie ihre Energie auf die Nanopartikel übertragen, miteinander vergleichen zu können, wurden für jede LHCII-Variante der maximale Energietransfer bestimmt. Hierzu wurden 15 nM LHCII-Trimere mit einem fünffachen Überschuss an QDs versetzt, 90 min auf Eis inkubiert und Emissionsspektren aufgenommen. Nach einer Dekonvolution der Spektren wurde die prozentuale Löschung der LHCII-Fluoreszenz durch einen Vergleich mit der Ausgangsfluoreszenz von freiem LHCII ermittelt (Abb. 3.25).

Die LHCII-Variante $\Delta N11$ verfügt über keine Bindesequenzen (Werwie, 2012), kann daher nicht an die QDs binden und es findet folglich auch keine Löschung der LHCII-Fluoreszenz statt. Für alle anderen LHCII-Varianten gilt folgende Reihenfolge bei der maximalen Fluoreszenzlöschung durch Typ-II QDs: Z8- $\Delta N11$ < D7f3 < tC-C79S < $\Delta N11$ -h < C3.2h < h- $\Delta N11$ < S3/160Ch < h- $\Delta N11$ -h.

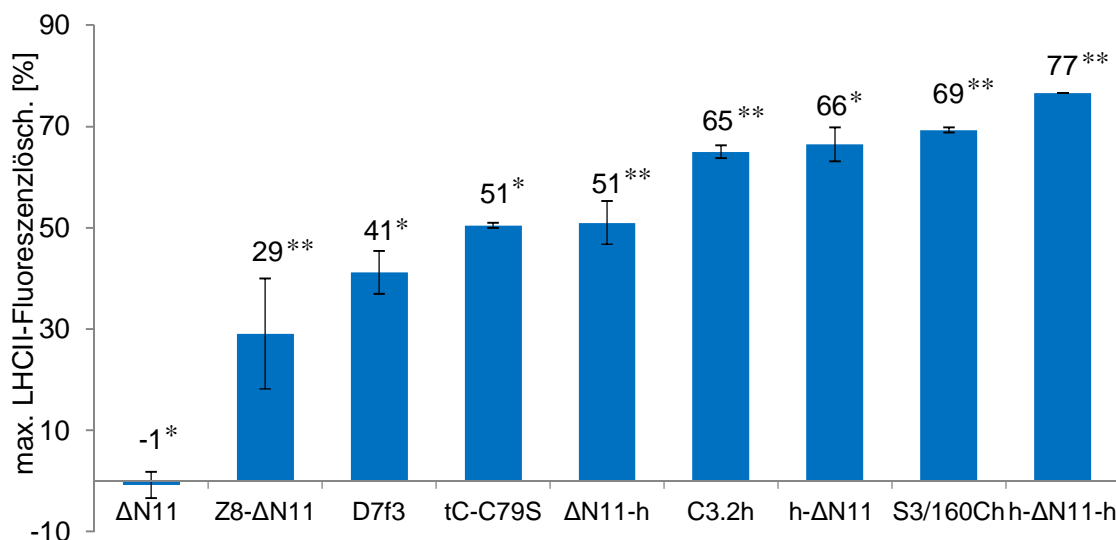


Abb. 3.25 Maximale Fluoreszenzlöschung verschiedener LHCII-Varianten in Hybridkomplexen mit Typ-II QDs. 45 nM LHCII wurden jeweils mit 15 nM QDs, 2 mM TCaEP in *Standardpuffer* vermischt und nach 90 min auf Eis wurden Emissionsspektren ($\lambda_{ex}=470$ nm) aufgenommen. Nach der Dekonvolution der Spektren konnte die anteilige LHCII-Fluoreszenz mit der jeweiligen Ausgangsfluoreszenz einer reinen LHCII-Probe verglichen und die prozentuale Löschung der LHCII-Fluoreszenz ermittelt werden. Graue Balken: Standardabweichungen von zwei* oder drei** unabhängigen Messungen.

3.6 Triaden - Hybridkomplexe aus LHCII, Farbstoffen und Quantum Dots

Eine funktionierende Triade aus LHCII, dem Farbstoff Alexa Fluor 555-Maleimide (Alexa₅₅₅-Mal) und Typ-II QDs wurde bereits vorgestellt Werwie, 2012. Dabei konnte gezeigt werden, dass die sogenannte „Grünücke“ des LHCII prinzipiell durch dessen Markierung mit Farbstoffen aufgefüllt und diese zusätzliche Energie innerhalb der Triade auch vom QD genutzt werden kann.

Der Weg bis zu dieser Triade war jedoch holprig, da sich bis dahin in der LHCII-Markierung bewährte Farbstoffe wie Rhodamine Red® C₂ maleimide (Rho₅₆₀-Mal) und Bodipy 577-Maleimide (Bodipy₅₇₇-Mal) solche Triaden mit Typ-II QDs als nicht geeignet herausgestellt haben. Hier wurde das Apoprotein des 3xCh (S3,106,160Ch) jeweils mit beiden Farbstoffen markiert und Trimere hergestellt (vgl. 2.4.8.1 und 2.4.4). Es zeigte sich, dass die Mischung mit QDs in einem 1 zu 1 Verhältnis in beiden Fällen zu einer fast vollständigen Löschung der QD-Fluoreszenz führte (Daten nicht gezeigt). Da dieses Phänomen nicht beobachtet wurde, wenn unmarkierter 3xCh mit QDs vermischt wurde, musste davon ausgegangen werden, dass die Anwesenheit des Farbstoffes zu einer Löschung der QD-Fluoreszenz führte. Um diesen Vorgang genauer untersuchen zu können, wurden die entsprechenden Einzylcysteinmutanten zum 3xCh (also S3Ch, S106Ch und S160Ch) sowie die Mutante V229Ch (Cystein an Position 229) mit Rho₅₆₀-Mal markiert, die markierten Trimere in einem 1 zu 1 Verhältnis mit QDs in Standardpuffer und 2 mM TCaEP gemischt und Absorptions- sowie Exzitationspektren aufgenommen (vgl. 2.6.1.1 und 2.6.2.1).

Anhand der Absorptionsspektren konnte von einer einheitlichen Konzentration der verschiedenen LHCII-Trimere in den Hybridkomplexen ausgegangen werden (Daten nicht gezeigt). Die verschiedenen Triaden ließen sich am besten vergleichen, wenn man die Anregungsspektren mit der Emissionsdetektion bei 780 nm betrachtete (Abb. 3.26). Alle Hybridkomplexe mit Rho₅₆₀-Mal-markierten LHCII-Trimeren zeigten eine verminderte QD-Fluoreszenz im Vergleich zum Hybridkomplex mit unmarkiertem LHCII. Besonders stark fiel der fluoreszenzlöschende Effekt mit LHCII-Trimeren aus, die an Position 3 markiert wurden (S3Ch), hier wurde die QD-Fluoreszenz fast vollständig gelöscht. Die Markierung der Positionen 106 bzw. 229 des LHCII führte zu einer vergleichbaren Löschung der QD-Fluoreszenz. Am geringsten wurde die Emission der Nanopartikel gelöscht, wenn die Position 160 markiert wurde.

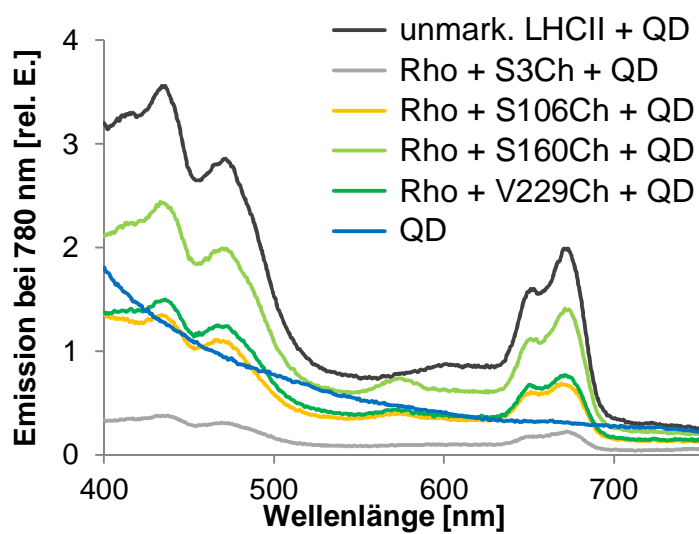


Abb. 3.26 Farbstoffbedingte QD-Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit der Markierungsposition. 45 nM Rho_{560} -Mal markierter Einzelcysteinmutanten und unmarkierter LHCII wurden jeweils mit 15 nM QDs und 2 mM TCaEP in Standardpuffer vermischt und nach 90 min Inkubation auf Eis Anregungs-spektren ($\lambda_{\text{em}} = 780 \text{ nm}$) auf-genommen. Außerdem wurden entsprechende Spektren einer 15 nM QD-Lösung ohne LHCII vermessen (blau). Dunkelgrau: unmarkierter LHCII, hellgrau: S3Ch, gelb: S106Ch, hellgrün: S160Ch, dunkelgrün: V229Ch.

Da sich der Alexa Fluor® 555 C2-maleimide (Alexa_{555} -Mal) in einer Triade mit LHCII und QD bereits bewährt hatte (siehe 3.5.1), wurde auch versucht, andere Alexa-Farbstoffe in einer solchen Konstellation auszuprobieren. Die Wahl der Farbstoffe fiel auf Alexa Fluor® 680 C2-maleimide (Alexa_{680} -Mal) und Alexa Fluor 750 C5-maleimide (Alexa_{750} -Mal), da diese aufgrund ihrer spektralen Eigenschaften als Akzeptorfarbstoffe für den LHCII fungieren und dabei eine Brücke zwischen LHCII und QD bilden sollten. Es war das Ziel, in einer solchen Anordnung den Energietransfer zwischen LHCII und QDs über die Farbstoffbrücke zu optimieren. Die Untersuchungen wurden 2011 von Heroldim Rahmen einer Bachelorarbeit durchgeführt.

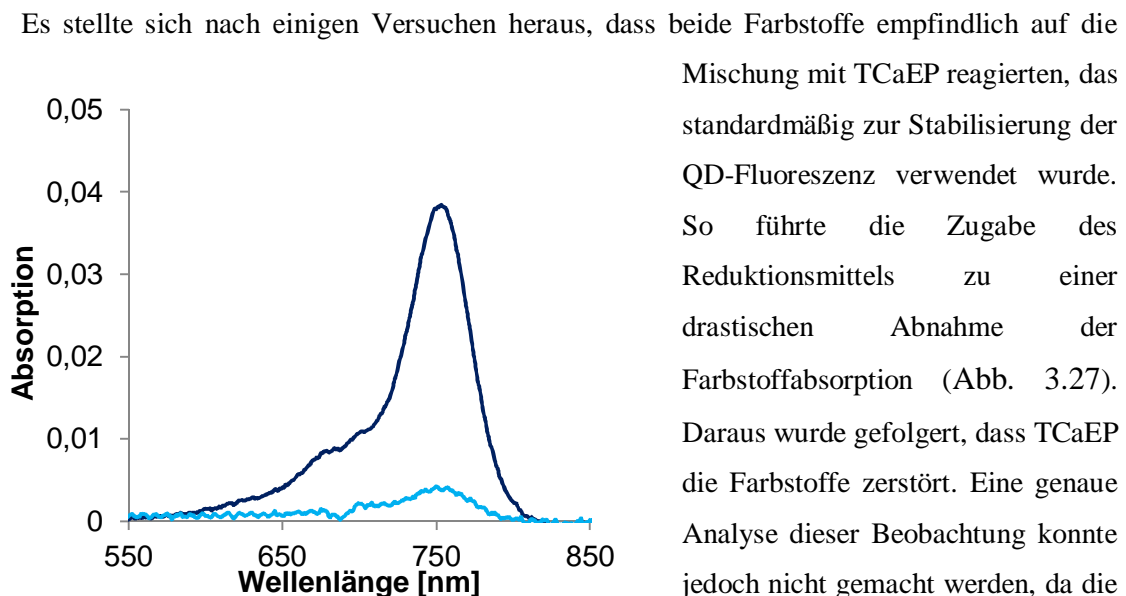


Abb. 3.27 Einfluss von TCaEP auf Alexa Farbstoffe. Absorptionsspektrum von Alexa_{750} -Mal (exemplarisch) vor (dunkelblau) und nach (hellblau) Zugabe des Reduktionsmittels TCaEP. (Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Heike Herold aufgenommen.)

Es stellte sich nach einigen Versuchen heraus, dass beide Farbstoffe empfindlich auf die Mischung mit TCaEP reagierten, das standardmäßig zur Stabilisierung der QD-Fluoreszenz verwendet wurde. So führte die Zugabe des Reduktionsmittels zu einer drastischen Abnahme der Farbstoffabsorption (Abb. 3.27). Daraus wurde gefolgert, dass TCaEP die Farbstoffe zerstört. Eine genaue Analyse dieser Beobachtung konnte jedoch nicht gemacht werden, da die Struktur des Farbstoffs vom Hersteller nicht bekannt gegeben wurde.

Dennoch wurde daraufhin eine Triade aus LHCII, Alexa₇₅₀-Mal und Typ II-QDs, die ihr Fluoreszenzmaximum bei 820 nm besaß, untersucht. Diese Nanopartikel unterschieden sich von den bisher verwendeten Typ-II QDs nur durch eine zusätzliche ZnS-Schicht (CdTe/3xCdSe/2xZnS/DHLA) und wurden eingesetzt, um die QD-Emission besser von der Farbstoff-Emission (Maximum bei ca. 750 nm) unterscheiden zu können. Für die Versuche wurden 15 nM markierter (Alexa₇₅₀-Mal) oder unmarkierter LHCII (S106ChC) mit und ohne QD in *Standardpuffer* unter Verzicht auf TCaEP zusammengemischt und 90 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden Emissionsspektren aufgenommen (Abb. 3.28). In den beiden Dyaden mit LHCII, also bei der Probe mit LHCII und QD sowie in der Probe mit LHCII und Farbstoff, lag die Fluoreszenzlöschung des LHCII zwischen 60 und 70 %, wobei die stärkere Löschung in der Dyade mit Farbstoff auftrat. Im Vergleich hierzu wurde die Fluoreszenz des LHCII in der Triade über 90 % gelöscht. Die Farbstofffluoreszenz nahm in der Triade im Vergleich zur entsprechenden Dyade ebenfalls ab. Dahingegen konnte keine Zunahme der QD-Fluoreszenz in der Triade gegenüber der entsprechenden Dyade beobachtet werden. Eine QD-Fluoreszenz konnte aber über eine Dekonvolution des Triaden-Spektrum ausgemacht werden (Daten nicht gezeigt). An dieser Stelle muss berücksichtigt werden, dass die QD-Fluoreszenz ohne die Anwesenheit von TCaEP sehr instabil ist (mehr dazu siehe 4.3.1).

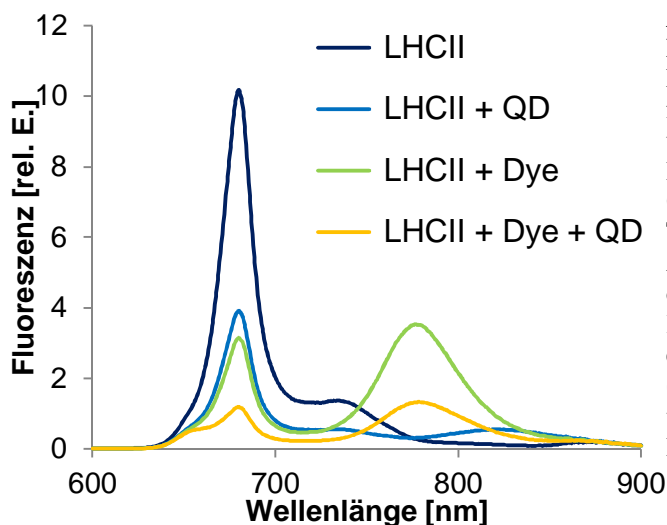


Abb. 3.28 Energietransfer in LHCII-Hybridkomplexen ohne TCaEP. Emissionsspektren $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ von freiem LHCII (S106ChC) (dunkelblau) und von verschiedenen S106ChC-Hybridkomplexen. Hellblau: S106ChC + QD, grün: S106ChC + Farbstoff, gelb: Triade aus S106ChC, Farbstoff und QD. Alle Proben wurden in *Standardpuffer* und ohne TCaEP angesetzt. LHCII-Trimer Konz: 15 nM, QD:15 nM. QDs besitzen eine ZnS-Schicht mehr als gewohnt (CdTe/3xCdSe/2xZnS/DHLA). (Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Heike Herold aufgenommen.)

3.7 Nachweis einer LHCII sensibilisierten Ladungstrennung in Typ-II QDs mit Hilfe des Elektronenakzeptors Methylviologen

3.7.1 Optimierung der Probenzusammensetzung

Nachdem sowohl die Bindung von verschiedenen LHCII-Varianten an die Oberfläche von QDs wie auch der Energietransfer zwischen den beiden Komponenten eingehend untersucht

worden war, sollte nun nachgeprüft werden, ob die Kopplung des LHCII auch zu einer Erhöhung der Ladungstrennung in den Nanopartikeln beitragen kann.

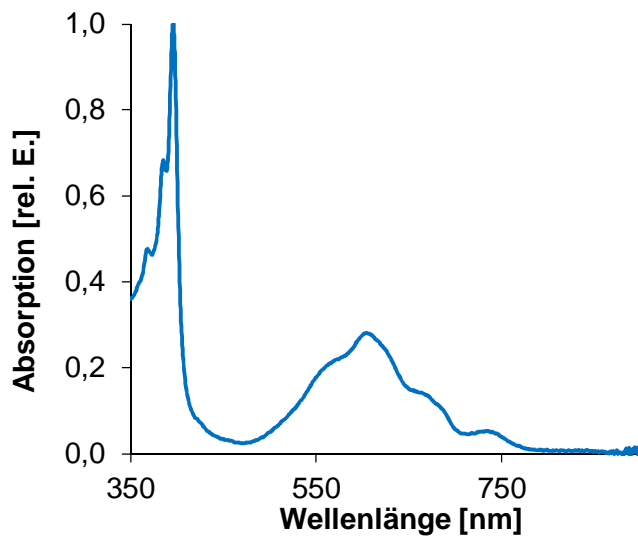


Abb. 3.29 Absorptionsspektrum von reduziertem Methylviologen. MV in einem Puffer aus 0,6 M Saccharose, 0,1 % LM, 50 mM NaP (pH 8.5) in Anwesenheit eines Reduktionsmittels nach 30 min Inkubation.

Um die Abgabe von Elektronen durch die QDs zu visualisieren, kam der Elektronenakzeptor Methylviologen (MV) zum Einsatz. Dieser ist in seinem oxidierten Zustand (MV^{2+}) farblos, zeigt aber nach Reduktion zu einem monokationischen Radikal (MV^+) eine charakteristische Absorption im sichtbaren Licht mit zwei Maxima bei 396 nm und bei 605 nm (Abb. 3.29).

Aufgrund des vergleichsweise niedrigen Extinktionskoeffizienten von MV mit $\epsilon_{(605\text{ nm})} = 13.700\text{ mol}^{-1}\text{ L cm}^{-1}$

(Watanabe, 1982) gegenüber dem LHCII mit $\epsilon_{(670\text{ nm})} = 546.000\text{ mol}^{-1}\text{ L cm}^{-1}$ (Butler, 1988) oder CdTe-QDs mit Extinktionskoeffizienten zwischen 150.000 und 400.000 $\text{mol}^{-1}\text{ L cm}^{-1}$ bei Größen von 4-6 nm (Yu, 2003) wurde zunächst versucht, ein günstiges Verhältnis von Elektronendonator (QD) und Elektronenakzeptor (MV) sowie günstige Konzentrationen der beteiligten Komponenten zu ermitteln, bei denen die reduzierte Form des MVs spektroskopisch nachweisbar ist.

Für die ersten Testversuche wurden Proben mit 15 nM QDs und 2 mM TCaEP in *Standardpuffer* hergestellt, wie sie auch für FRET Untersuchungen zusammengesetzt waren (vgl. 3.5.1). Ergänzt wurden sie mit 270 μM EDTA (Shelnutt, 1983) und 5,1 μM MV. Die Ansätze wurden mehrere Minuten mit Licht einer Wellenlänge von 350 nm angeregt und immer wieder Absorptionsspektren aufgenommen. Selbst nach einer 30 minütigen Belichtung konnte keine Veränderung der Absorption gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Erst nachdem die Konzentrationen einiger Komponenten deutlich erhöht wurden (QDs auf 750 nM, EDTA auf 27 mM, MV auf 5,1 mM), konnte bereits nach wenigen Minuten Belichtung mit 350 nm eine gut sichtbare Veränderung der Absorption gemessen werden (Abb. 3.30). Die Veränderung konnte aufgrund des charakteristischen Verlaufs eindeutig auf die Bildung von reduziertem Methylviologen zurückgeführt werden. Nach mehrfachem Invertieren der Probe wurde das MV^+ durch den anwesenden Sauerstoff oxidiert und somit wieder farblos. Die anschließende zweiminütige Belichtung mit 670 nm führte zu einer geringeren Produktion von MV^+ als die nach zeitgleicher Belichtung mit 350 nm.

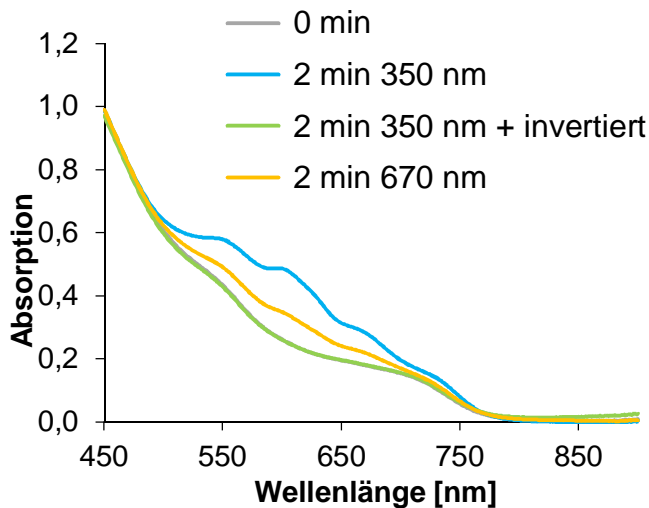


Abb. 3.30 Nachweis von MV^+ in einer QD-haltigen Lösung. Das Absorptionsspektrum von 750 nM QDs, 27 mM EDTA, 2 mM TCaEP und 5,1 mM MV in *Standardpuffer* vor (0 min, grau) und nach Belichtung für 2 min mit 350 nm (blau). Anschließend wurde die Probe mehrfach invertiert (grün) und 2 min mit 670 nm belichtet (gelb). (Das graue Spektrum ist nicht sichtbar, weil es von dem grünen Spektrum überlagert wird.)

In den Proben ist immer das Reduktionsmittel TCaEP enthalten, um die Stabilität der QDs zu gewährleisten (vgl. 3.2.1). Die Reduktion des MV^{2+} nur durch die Anwesenheit des Reduktionsmittels war daher nicht auszuschließen. Eine Probe, die nur MV, TCaEP und EDTA, also keine QDs enthält, zeigte ohne Belichtung keine Bildung von MV^+ (Abb. 3.31). Auch mit Belichtung konnte erst nach mehreren Minuten MV^+ gemessen werden. Enthielt die Probe kein TCaEP, wurde auch nach 7-minütiger Belichtung mit 350 nm kein MV^{2+} reduziert. Im Vergleich zu einer TCaEP-haltigen Probe, die auch QDs enthielt, wurde in der Probe ohne QDs wesentlich weniger MV^+ gebildet. Eine zweiminütige Belichtung der QD-haltigen Probe enthielt mehr als doppelt so viel MV^+ wie eine Probe ohne QD, die 7 min belichtet wurde.

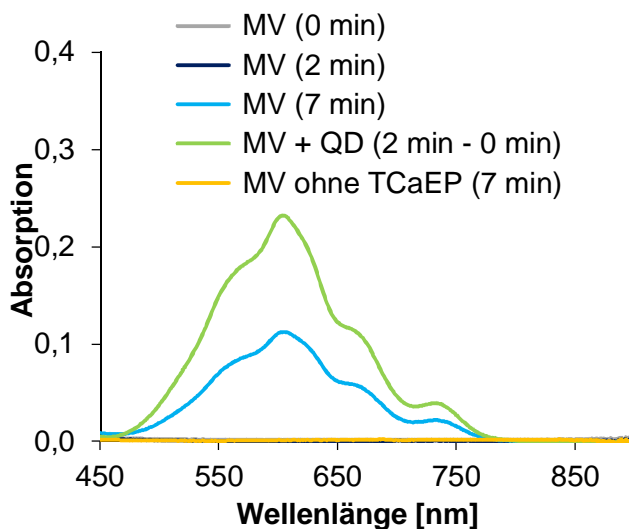


Abb. 3.31 Vergleich der Reduktion von MV durch Reduktionsmittel bzw. QDs. Absorptionsspektrum von 5,1 mM MV mit 2 mM TCaEP und 27 mM EDTA in *Standardpuffer* ohne Belichtung (0 min, grau), nach 2 min (dunkelblau) und nach 7 min (hellblau) Belichtung mit 350 nm sowie eine entsprechende Probe ohne TCaEP nach 7 min Belichtung mit 350 nm (gelb). Zum Vergleich dient das Differenzspektrum (grün) aus dem Absorptionsspektrum einer QD (750 nM) haltigen Probe nach zweiminütiger Belichtung mit 350 nm und ohne Belichtung. (Das graue und das dunkelblaue Spektrum werden vom gelben Spektrum überlagert.)

3.7.2 Entfernung des Sauerstoffs durch Entgasen

Da die Anwesenheit von Sauerstoff in den Lösungen immer wieder zu schwer reproduzierbaren Ergebnissen geführt hatte, sollte der Sauerstoff in den Proben entfernt werden. Das Entgasen der einzelnen Lösungen durch Unterdruck konnte für alle Lösungen ohne

Detergenz problemlos durchgeführt werden (2.4.10.1). Die detergenzhaltige LHCII-Lösung sowie das Detergenz selbst konnten nicht entgast werden. Stattdessen wurde die LHCII-Lösung aufkonzentriert, um den LHCII mit möglichst kleinen Volumina (also auch mit geringeren Mengen an Sauerstoff) zur Probe geben zu können. Auch das Detergenz wurde aus der 10 %-Stammlösung einzeln zum Ansatz hinzugegeben. Nach dem die verschiedenen Ansätze fertig pipettiert waren, wurden diese vor Verschließen der Gefäße sowie nach Umfüllen in die Messküvetten noch mit Stickstoff geflutet, um ein mögliches Rücklösen von Sauerstoff zu verhindern.

In den Ansätzen befanden sich 5,1 mM MV, 10 mM EDTA und 2 mM TCaEP in *Standardpuffer* und zusätzlich je nach Probe 0,5 μM QDs bzw. 0,5 μM LHCII und 0,5 μM QDs. Um eventuell auf eine LHCII sensibilisierte Ladungstrennung rückschließen zu können, wurden die Proben mit rotem Licht (670 nm) belichtet, da hier der LHCII ein Absorptionsmaximum hat und gleichzeitig die QDs verhältnismäßig wenig Licht absorbieren. In der Probe, die nur QDs enthielt, konnte man schon nach wenigen Sekunden die Entstehung von MV^+ beobachten (Abb. 3.32 A).

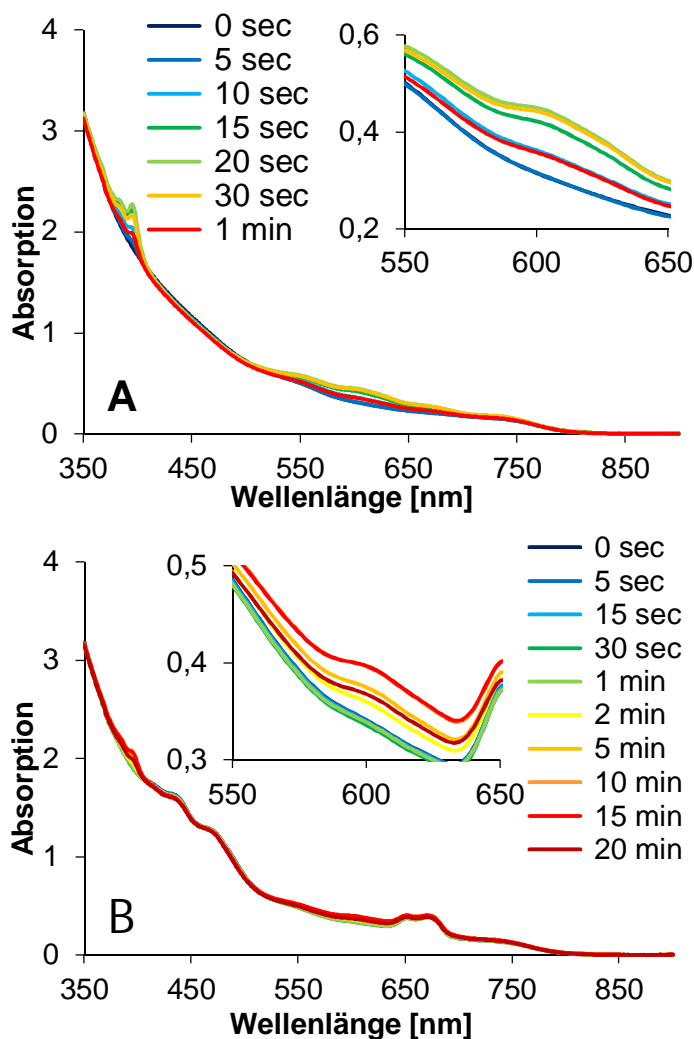


Abb. 3.32 Nachweis der Ladungstrennung in QDs mit Hilfe von Methylviologen nach Entfernung des Sauerstoffs durch Entgasen der Lösungen. Absorptionsspektren einer Lösung mit 5,1 mM MV, 10 mM EDTA und 2 mM TCaEP in *Standardpuffer* vor und nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 670 nm. Die Proben wurden eine bestimmte Zeit belichtet, anschließend ein Absorptionsspektrum aufgenommen und erneut belichtet usw. Die Proben mit LHCII und QDs wurden zunächst für 90 min auf Eis gelagert. Die Inlets stellen jeweils eine Vergrößerung des Ausschnitts zwischen 550 nm und 650 nm dar. A: mit 0,5 μM QDs. B: mit 0,5 μM QDs + 0,5 μM LHCII.

Das typische Signal um die 600 nm nahm bis zu einer Belichtung von 20 sec stets zu, stagnierte dann aber nach 30 sec Belichtung und lag nach einer Minute sogar wieder unter dem Level der Belichtung von 5 sec. Im Gegenzug dazu konnte in der Probe mit QDs und LHCII erst nach 2 min Belichtung eine Zunahme der Absorption bei 600 nm beobachtet werden (Abb. 3.32 B). Diese nahm bis zu einer Belichtungszeit von 15 min stets zu, fiel dann aber nach 20 min wieder unter das Niveau von 5 min.

3.7.3 Entfernung des Sauerstoffs durch Enzym-Mix aus Oxidase und Katalase

Um den Sauerstoff in den Lösungen zu entfernen, wurde noch eine alternative Methode ausprobiert. Mit Hilfe der Enzyme Glucose-Oxidase und Katalase kann Sauerstoff in wässrigen Lösungen entfernt werden. In Anwesenheit von D-Glucose setzt die Glucose-Oxidase zwei Sauerstoff-Moleküle um. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird dann durch die Katalase zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt, so dass in der Nettoreaktion pro D-Glucose ein Sauerstoff-Molekül umgesetzt wird. Fügt man einer Lösung eine bestimmte Menge dieser Enzyme zu, ist nach wenigen Minuten der gesamte Sauerstoff in der Lösung verbraucht (siehe 2.4.10.2).

Analog zu den Versuchen mit den entgasten Lösungen wurden mehrere Proben hergestellt, die jeweils 5,1 mM MV, 10 mM EDTA und 2 mM TCaEP in *Standardpuffer* enthielten. Zusätzlich wurden jetzt noch 0,3 % D-Glucose und 1-2 μ l eines Enzym-Mix aus Glucose-Oxidase und Katalase hinzugegeben (Englander, 1987). Auch in dieser Versuchsreihe sollte Proben mit nur QD bzw. mit LHCII und QD betrachtet werden. Die LHCII-Konzentration wurde hier gegenüber dem Versuch mit den entgasten Lösungen verdreifacht, so dass die Trimer-Konzentration mit 0,5 μ M der QD-Konzentration entsprach. Zusätzlich wurde eine Probe hergestellt, die nur LHCII enthielt. Als Referenz diente ein Ansatz, der weder LHCII noch QDs beinhaltete. Es wurden, wie gehabt, Absorptionsspektren vor und nach bestimmten Zeitabständen der Belichtung mit 670 nm aufgenommen (Abb. 3.33). Bei allen Proben konnte direkt nach der ersten Belichtung schon eine Veränderung der Absorption bei 600 nm bzw. bei 390 nm beobachtet werden (Abb. 3.33, 1-4A). Diese Absorptionsveränderung nahm mit der Belichtungszeit bei allen Proben ausnahmslos zu, es konnte also kein Rückgang des entstandenen MV^+ beobachtet werden. Um die Proben untereinander vergleichen zu können, wurden Differenzspektren von den Proben mit QDs bzw. LHCII sowie QDs und LHCII erstellt. Dabei wurde von jedem Spektrum nach Belichtung das Ausgangsspektrum vor Belichtung abgezogen, so dass man den Verlauf der Bildung von MV^+ zu jedem Zeitpunkt nachvollziehen konnte. Im Vergleich wurde am wenigsten MV^+ in dem Ansatz ohne LHCII oder QDs gebildet. Etwas mehr MV^+ entstand in der Probe mit LHCII und deutlich mehr wurde im Ansatz mit QDs

reduziert, wenn auch nicht so viel wie in einem Ansatz mit QDs und LHCII. In den Proben mit LHCII ist in den Differenzspektren mit zunehmender Belichtungszeit eine verstärkte Zunahme von Signalen bei im Bereich von 420 bis 480 nm und im Bereich von 650 bis 680 nm zu sehen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei der Belichtung ein Teil des LHCII ausbleichte, so dass bei der Subtraktion des Spektrums vor Belichtung von den Spektren nach Belichtung mehr LHCII abgezogen wurde, als in den entsprechenden belichteten Proben noch an LHCII vorhanden war.

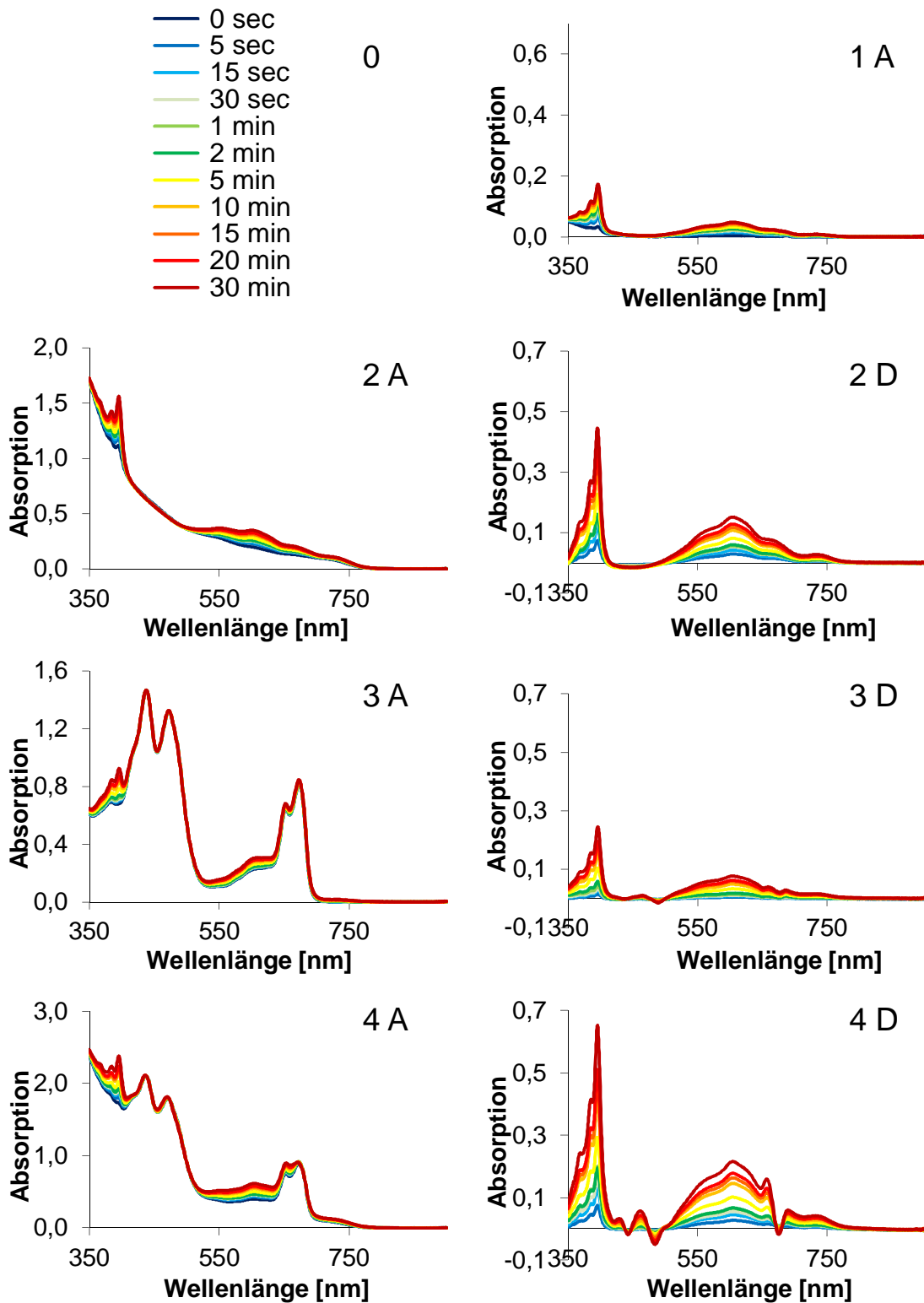


Abb. 3.33 Untersuchung einer LHCII sensibilisierten Ladungstrennung in QDs mit Hilfe von MV nach Entfernung des Sauerstoffs durch einen Enzym-Mix aus Glucose-Oxidase und Katalase. Alle Proben enthielten 5,1 mM MV, 4 mM TCaEP, 10 mM EDTA, 1,5 μ L Enzymmix, 0,3 % D-Glucose und befanden sich in *Standardpuffer*. Die Proben wurden mit Rotlicht belichtet (670 nm) und nach verschiedenen Belichtungszeiten Absorptionsspektren (A) aufgenommen. Zum direkten Vergleich wurden Differenzspektren (D) erstellt, bei denen jeweils das Ausgangsspektrum (0 min) von den anderen Spektren (5 sec – 30 min) abgezogen wurde. 0: Legende. 1: MV pur. 2: + QDs (0,5 μ M). 3: + LHCII* (0,5 μ M). 4: + LHCII* (0,5 μ M) + QDs (0,5 μ M). * Die Konzentration bezieht sich auf LHCII-Trimere.

Aus den in Abb. 3.33 dargestellten Spektren lässt sich nicht ohne weiteres ablesen, ob in der Probe mit LHCII und QDs tatsächlich eine LHCII sensibilisierte Ladungstrennung stattfand, denn hierfür muss auch berücksichtigt werden, dass die Zugabe von LHCII zur MV-Lösung auch ohne QDs eine Erhöhung der Bildung von MV^+ zur Folge hatte. Außerdem muss bei allen Proben bedacht werden, dass schon das reine Puffersystem einen Teil des MV^{2+} reduziert. Aus diesem Grund wurde für jede Probe zunächst zur Übersicht der zeitliche Verlauf der Bildung von MV^+ gegen die Konzentration in ein Diagramm aufgetragen (Abb. 3.34 A). Hier lässt sich gut erkennen, dass die Produktion von MV^+ in der Probe mit QDs bzw. LHCII und QDs zu jedem Zeitpunkt höher ist als in der Probe mit nur LHCII bzw. nur QDs. Um zu überprüfen, ob die Nettoproduktion im Ansatz mit LHCII und QDs höher ist als in der Summe der jeweiligen Einzelkomponenten, wurde von jeder Reihe der Grundumsatz an MV^+ abgezogen und erneut in einem Diagramm eingetragen (Abb. 3.34 B). Die Reihen der Proben mit nur LHCII und nur QDs wurden addiert und ebenfalls ins Diagramm eingefügt. Erst so ließ sich erkennen, dass in der Probe mit LHCII und QDs mehr MV reduziert wird als in der Summe der Einzelproben mit nur QDs und nur LHCII.

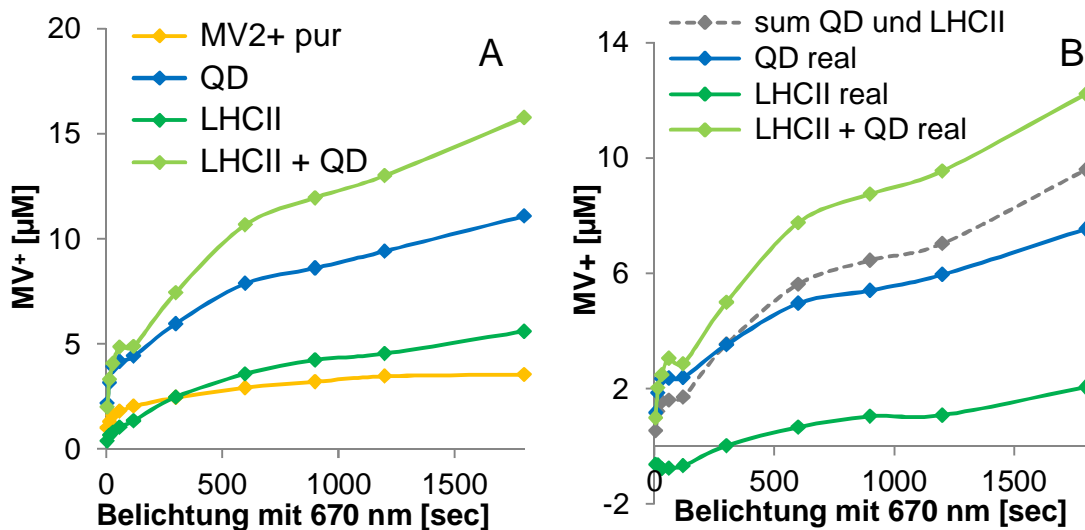


Abb. 3.34 Bildung von MV^+ nach Entfernung des Sauerstoffs durch einen Enzym-Mix aus Glucose-Oxidase und Katalase. A: Konzentrationsbestimmung von MV^+ über die Spektren 1A, 2D, 3D und 4D aus Abb. 3.33. LHCII und QD (hellgrün), QDs (blau), LHCII (dunkelgrün), nur MV (gelb). B: Darstellung der Nettoproduktion von (MV^+). Der Anteil an entstehendem MV^+ in der reinen MV-Probe wurde von den restlichen Reihen in A abgezogen und so die reale MV^+ -Bildung bestimmt. QD (blau), LHCII (dunkelgrün), LHCII + QD (hellgrün). Außerdem wurde die Summe aus der Probe mit QD real und mit LHCII real gebildet (grau gestrichelt).

Analog zum vorangehenden Versuch wurde die Bildung von MV^+ in Ansätzen untersucht, in denen der Sauerstoff durch den Enzym-Mix entfernt wurde, jedoch ohne Zugabe des Reduktionsmittel TCaEP (Abb. 3.35). In der TCaEP-freien Probe, die nur MV enthielt, wurde mehr als doppelt so viel reduziert, wie in der analogen Probe mit TCaEP (siehe Abb. 3.34). Dies gilt auch für die Proben mit LHCII bzw. mit QDs. Ohne die Zugabe von TCaEP wurde

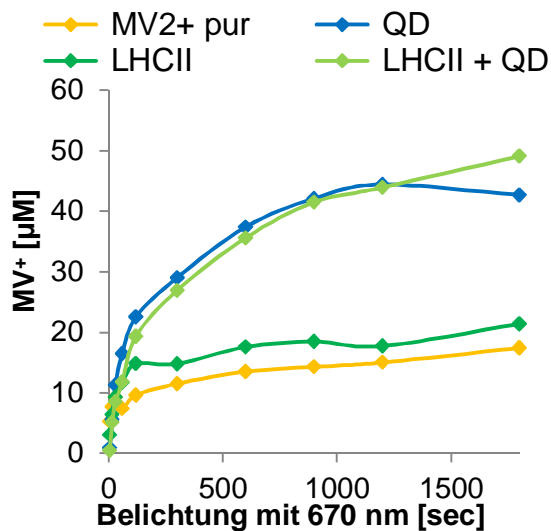


Abb. 3.35 Bildung von MV^+ nach Entfernung des Sauerstoffs durch einen Enzym-Mix aus Glucose-Oxidase und Katalase in Ansätzen ohne TCaEP. Konzentration von MV^+ in Probenansätzen mit LHCII und QD (hellgrün), QDs (blau), LHCII (dunkelgrün), nur MV (gelb) nach verschiedenen Belichtungszeiten mit Rotlicht (670 nm). Die Daten wurden, wie für Abb. 3.33 und Abb. 3.34 beschrieben, erhoben, mit dem Unterschied, dass alle Proben ohne TCaEP angesetzt wurden.

die Konzentration an MV^+ gegen die Inkubationszeit aufgetragen (Abb. 3.36 B). Bereits nach 5 sec Inkubationszeit der Probe wurde MV^+ gemessen, dessen Konzentration fast linear mit der Zeit zunahm und nach 30 min ca. 12 μM betrug. Damit liegt die MV^+ -Konzentration nur etwas unterhalb derselben Probe, die zusätzlich belichtet wurde und knapp über 17 μM MV^+ enthielt (Abb. 3.35).

deutlich mehr MV^+ produziert als mit TCaEP. Im Gegensatz zur Versuchsreihe mit TCaEP führte jedoch die Mischung von LHCII und QDs nicht zu einer gesteigerten MV^+ -Bildung im Vergleich zum Ansatz, der nur QDs enthielt.

Im Rahmen einer Bachelorarbeit wurde von Anita Bohlender untersucht, ob alleine die Zugabe des Enzym-Mix aus Glucose-Oxidase und Katalase zu einer Reduktion des MV führte. Dabei wurde zunächst auf die Zugabe von TCaEP und eine Belichtung der Proben verzichtet. Es wurden nach bestimmten Inkubationszeiten im Dunkeln Absorptionsspektren aufgenommen (Abb. 3.36 A) und anhand dieser Spektren

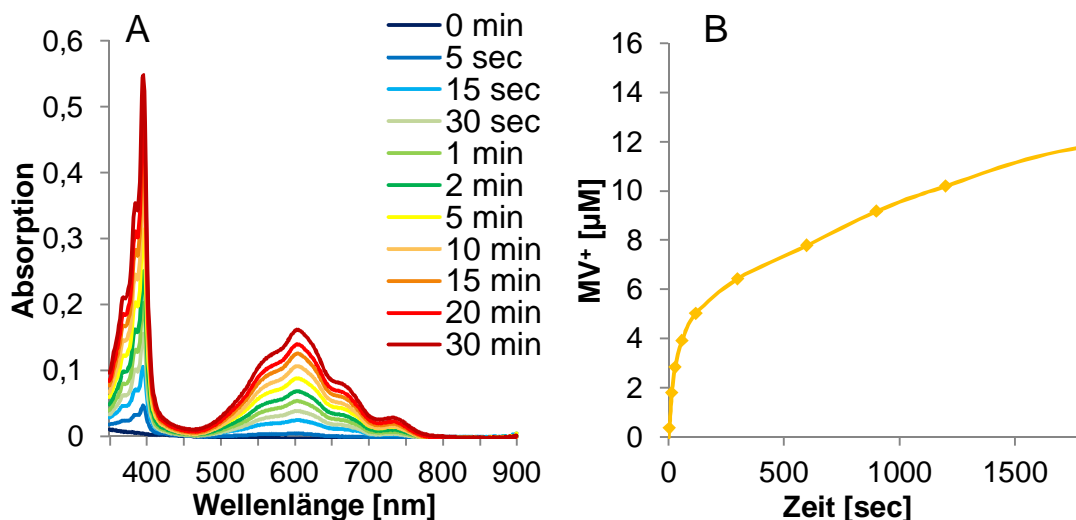


Abb. 3.36 Untersuchung der Reduktion von MV durch Glucose-Oxidase und Katalase. Alle Proben enthielten 5,1 mM MV, 10 mM EDTA, 0,3 % D-Glucose, 2 μL Enzym-Mix und befanden sich in Standardpuffer. A: Absorptionsspektren der Probe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zusammensetzung. B: Aus den Absorptionsspektren in A wurde die Konzentration an MV^+ berechnet und gegen die Inkubationszeit aufgetragen (Daten wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit von Anita Bohlender aufgenommen).

3.8 Integration von LHCII-Hybridkomplexen in Solarzellen

3.8.1 LHCII-Adsorption auf TiO₂-Platten

Eine Idee der technischen Anwendbarkeit von LHCII-Hybridkomplexen mit Farbstoffen oder QDs ist die Integration solcher Komplexe in Solarzellen nach dem Vorbild sogenannter *dye-sensitized solar cells* (DSSCs, vgl. 1.3.1). Als Halbleiter wird hier bevorzugt TiO₂ verwendet, daher war einer der wichtigsten ersten Schritte Glasplatten mit einer TiO₂-Schicht zu belegen, deren Poren groß genug sind, um LHCII-Trimere bzw. eventuell noch größere Hybridkomplexe aufzunehmen. Zunächst wurden nach Marke Eigenbau Glas-Platten mit kolloidalen TiO₂ der Firma Degussa (P25, Degussa AG, Darmstadt) beschichtet (siehe 2.4.11.1). Dabei entstanden Platten mit einer Schichtdicke von ca. 50 µm (vgl. Lion, 2005). Im Allgemeinen wurden für die Benetzung der Platten C3.2h-Trimere (in Puffer: 0,6 M Saccharose, 0,1 % LM, 5 mM Tris/HCl pH 7.5) und eine Benetzungsdichte von 0,1 nmol LHCII (bezogen auf Monomere) pro cm² Glas-Platte gewählt. Nach einer Inkubation über Nacht wurden die Platten zweifach mit Puffer gewaschen und erneut wie beschrieben mit LHCII-Trimeren belegt, inkubiert und gewaschen. Die Berechnung der Belegungsdichte an LHCII-Trimeren auf der TiO₂-Platte erfolgte jeweils indirekt durch die Aufnahme von Absorptionsspektren der Waschüberstände. Dadurch ließ sich die LHCII-Konzentration in den Überständen bestimmen und über eine einfache Rechnung die Menge des an TiO₂-gebundenen LHCII ermitteln.



Abb. 3.37 Benetzung von TiO₂-Platten mit LHCII-Trimeren. TiO₂-Platten aus eigener Herstellung vor (links) und nach (rechts) Benetzung mit LHCII-Lösung.

Schon anhand der Grünfärbung der mit LHCII-Trimeren benetzten Platte konnte von einer Belegung des TiO₂ ausgegangen werden (Abb. 3.37). Die Berechnung der Belegungsdichte mit LHCII anhand der Absorptionsspektren des Überstands ergab im Mittel (2 Platten) eine LHCII-Belegung von ca.

0,06 nmol/cm² (bezogen auf Monomere). Dieser Wert lag jedoch bei weniger als einem Zehntel der maximalen Belegungsdichte (0,9 nmol/cm²), die Manuel Lion (2005) im Rahmen seiner Dissertation erzielt hatte. Zwar konnte er diese Belegungsdichte auch erst nach vielen Tagen der wiederholten Inkubation mit LHCII-Trimeren erzielen, aber schon nach zwei Tagen lag diese mit 0,2 nmol/cm² deutlich über der an dieser Stelle erzielten Belegungsdichte.

Neben der Erhöhung der LHCII-Belegungsdichte war aber auch eine Verringerung der TiO_2 -Schichtdicke ein angestrebtes Ziel. Dies sollte es unter Umständen ermöglichen, durch die Aufnahme von Absorptionsspektren der Platte direkt auf die Anzahl von adsorbierten Molekülen rückschließen zu können. Besonders für Bestimmung der Adsorption von Farbstoffen, die in organischem Lösungsmittel gelöst werden, wäre dieser Weg aufgrund der hohen Flüchtigkeit des Lösungsmittels eine erhebliche Vereinfachung (mündliche Mitteilung Chen Li, AG Müllen, MPI für Polymerforschung, Mainz). Aus diesem Grunde wurden nachfolgend TiO_2 -Platten mit Schichtdicken zwischen 1 und 10 μm hergestellt. Außerdem sollten bei der Herstellung kolloidale TiO_2 -Partikel mit einer Größe von 50-100 nm verwendet werden, um nach dem Sinterprozess größere Poren zu erhalten und mehr LHCII-Trimere in die Schicht integrieren zu können.

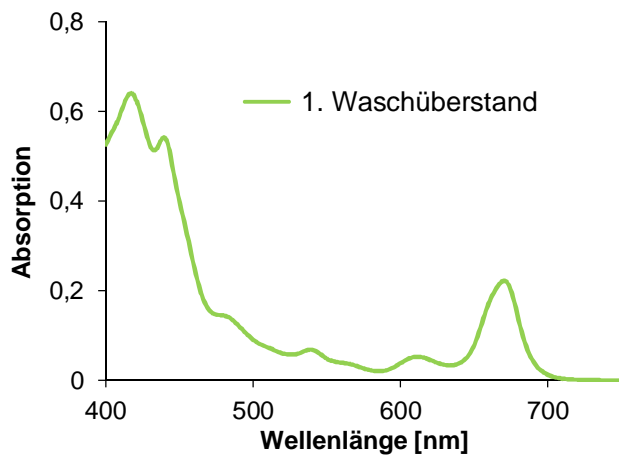


Abb. 3.38 Waschüberstand einer TiO_2 -Platte in Eigenproduktion (AG Müllen, MPI für Polymerforschung, Mainz). Absorptionsspektrum des 1. Waschüberstandes einer TiO_2 -Platte, die nach der Inkubation mit einer LHCII-Lösung über Nacht mit Puffer gewaschen wurde. Die TiO_2 -Partikelgröße zur Herstellung der Platten betrug 100 nm, die Schichtdicke der Platte 7 μm .

Eine Auswahl an Ergebnissen soll aufzeigen, welche Schwierigkeiten bei der Herstellung der TiO_2 -Platten immer wieder auftraten. So führte die Verwendung von 100 nm großen TiO_2 -Partikeln bei der Herstellung einer Platte mit einer Schichtdicke von nur 5-7 μm zwar zu einer ordentlichen LHCII-Belegung, aber die Absorptionsspektren der Waschfraktionen wiesen auf gelöstes TiO_2 in den Überständen hin (Abb. 3.38). Auch einige Löcher auf den Platten nach der LHCII-Inkubation deuteten darauf hin, dass das TiO_2 nicht stabil auf der Glasplatte haften blieb.

Eine Veränderung der Temperatur beim Sinterprozess führte zwar zu einer Verbesserung der TiO_2 -Stabilität, so dass dieses sich nicht mehr im Waschpuffer löste, jedoch fielen immer wieder ganze Bruchstücke der TiO_2 -Beschichtung ab (Abb. 3.39). Grund hierfür war der hohe Druck auf die Partikel während des Sinterprozesses als eine Folge der Veränderung der Temperatur (mündliche Mitteilung Christian Geidel, AG Müllen, MPI für Polymerforschung, Mainz). Dennoch konnte bei diesen Platten nach einer zweifachen LHCII-Inkubation anhand der Absorptionsspektren der Waschüberstände die adsorbierte Menge an LHCII bestimmt werden: 0,13 nmol/cm^2 bzw. 0,12 nmol/cm^2 (Monomere) bei einer TiO_2 -Schichtdicke von 5,2 μm bzw. 3,0 μm . Dies entsprach bereits der doppelten Menge an adsorbiertem LHCII

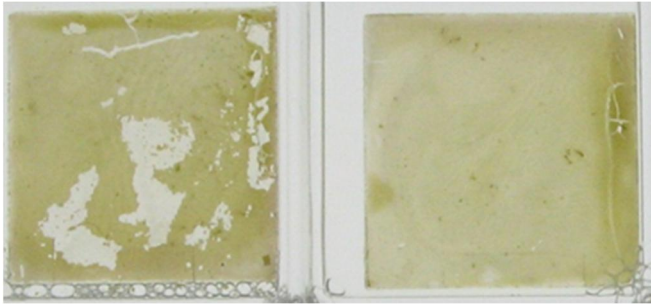


Abb. 3.39 Mit LHCII benetzte TiO₂-Platten nach Veränderung des Sinterprozesses während Platten-Herstellung. TiO₂-Platten nach einer Belegung mit LHCII-Trimeren. Bei der Herstellung der Platten wurde zur Erhöhung der Stabilität der TiO₂-Schicht die Sinter Temperatur variiert. Die TiO₂-Partikelgröße zu Herstellung der Platten betrug 100 nm, die Schichtdicke der Platte 5,2 µm (links) und 3,0 µm (rechts).

gegenüber den Ausgangsversuchen, obwohl die Schichtdicke des TiO₂ nur noch knapp 1/10tel betrug.

Weitere Variationen der Sinter Temperatur führten nicht zu einer nennenswerten Verbesserung der TiO₂-Stabilität auf den Platten. Als Hauptursache für die Instabilität des TiO₂ wurde die Ausgangsgröße der TiO₂-Partikel mit 100 nm vermutet (mündliche Mitteilung Chen Li und Christian Geidel). Daher wurde

anschließend auf kommerziell hergestellte TiO₂-Platten zurückgegriffen, die zwar mit deutlich kleineren TiO₂-Partikel (20-50 µm) hergestellt wurden, aber durch einen ganz bestimmten (nicht weiter bekannt gegebenen)

Prozess bei der Herstellung relativ große Poren enthalten sollten. Diese Platten zeigten neben einer relativ hohen Stabilität des TiO₂ eine Belegungsdichte von durchschnittlich 0,17 nmol/cm² (zweifache LHCII-

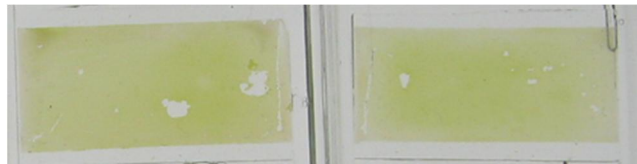


Abb. 3.40 Mit LHCII benetzte TiO₂-Platten aus kommerzieller Herstellung. TiO₂-Platten nach einer Belegung mit LHCII-Trimeren (Hersteller nicht bekannt). Die TiO₂-Partikelgröße zu Herstellung der Platten betrug 20-50 nm, die Schichtdicke der Platten 5,3 µm.

Inkubation, TiO₂-Schichtdicke 5,3 µm) (Abb. 3.40). Da diese kommerziell erworbenen TiO₂-Platten nicht aus mit Fluor beschichtetem Glas (FTO-Glas, „fluorine doped tin oxide“) bestanden und solche auch nicht bestellt werden konnten, wurde versucht, auf der Basis der dort verwendeten TiO₂-Partikel Platten selbst herzustellen. Bisherige Versuche waren bislang wenig erfolgversprechend, da es nicht gelang, Platten herzustellen, auf denen annähernd ähnliche Mengen an LHCII-Trimeren gebunden werden konnten.

Die Firma Solaronix bietet kleine Modelle von Solarzellen zum Verkauf an und in diesem Rahmen wurden einige TiO₂-Platten dieses Anbieters erworben. Es handelt sich bei diesen Platten um mit FTO (Fluor dotierte Zinnoxide) beschichtete Gläser. Eine zweifache Inkubation mit LHCII-Trimeren über Nacht bei einer jeweiligen Benetzungsdichte von 0,3 nmol/cm² führte hier zu einer Belegung von ca. 0,3 nmol/cm² (Abb. 3.41). Diese Belegungsdichte konnte schon fast nach der ersten Inkubation mit LHCII erreicht werden; die zweite

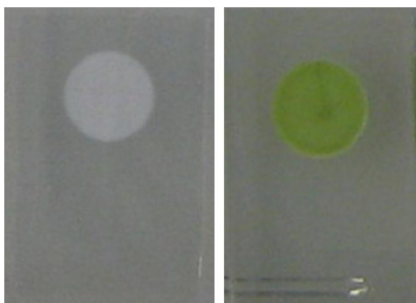


Abb. 3.41 Mit LHCII benetzte TiO₂-Platten der Firma Solaronix. TiO₂-Platte vor (links) und nach (rechts) einer Belegung mit LHCII. Die TiO₂-Partikelgröße ist nicht bekannt, die Schichtdicke der Platten betrug 60 µm.

LHCII-Benetzung führte nur noch zu einer geringfügigen Erhöhung der LHCII-Belegung. Die Stabilität der Platten schien ausreichend, so dass fortführende Versuche zur Integration von LHCII-Hybridkomplexen durchgeführt werden sollten.

3.8.2 LHCII-Farbstoff-Komplexe auf TiO₂-Platten

Um das ganze Projekt etwas voranzutreiben, sollten die kleinen TiO₂-Platten der Firma Solaronix mit einem zur Ladungstrennung fähigen Akzeptorfarbstoff der AG Müllen und mit LHCII-Trimeren über Koadsorption belegt werden. Die Aufnahme von Aktionsspektren sollte dabei erste Hinweise geben, ob der LHCII seine Energie auf den Farbstoff überträgt und eine LHCII-stimulierte Elektroneninjektion des Farbstoffs beobachtet werden kann. Bei dem Farbstoff handelt es sich um einen Terrylen-Farbstoff, genauer gesagt um Terrylen-Diimide-Glutarsäure (TDI_{Gs}), der von Glauco Battagliani (AG Müllen, MPI für Polymerforschung, Mainz) hergestellt wurde. Dieser ist aufgrund seines Absorptionsmaximums bei ca. 680 nm ein möglicher Energieakzeptor in einem Hybridkomplex mit dem LHCII. Von der kovalenten Verknüpfung an den LHCII über einen Maleimid-funktionalisierten ähnlichen Farbstoff (Terrylen-Monoimid-Monoanhydrid-Maleimid) wurde abgesehen, da vorangegangene Experimente gezeigt haben, dass die kovalente Verknüpfung zu einer starken hypsochromen Verschiebung des Absorptionsspektrum führte und dieser sich daher nicht mehr als Akzeptorfarbstoff für den LHCII eignete (Gundlach, 2010).

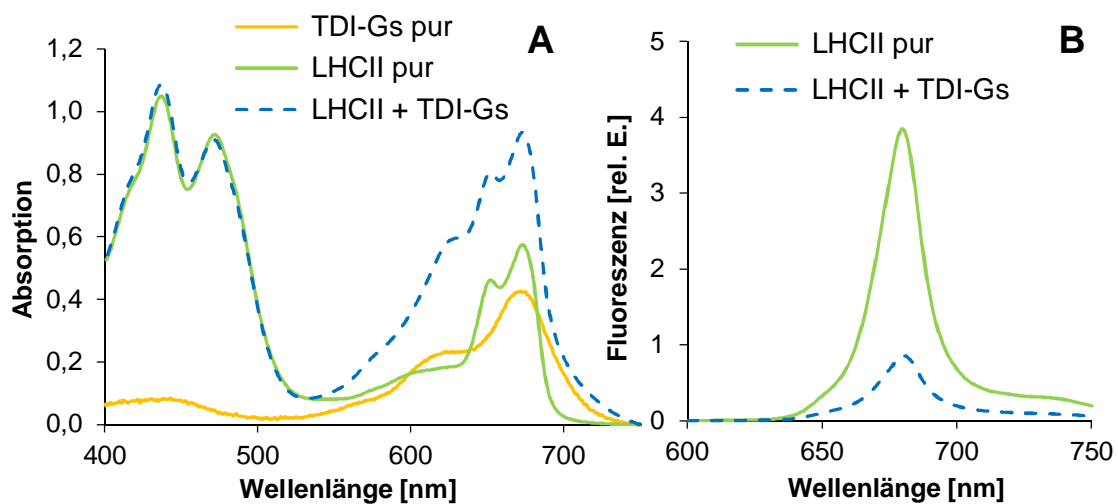


Abb. 3.42 Möglicher Energietransfer von LHCII-Trimeren auf Farbstoff TDI_{Gs}. Lösung aus ca. 1 μ M LHCII und ca. 5 μ M TDI_{Gs} (blau) bzw. reinem LHCII (grün). A: Absorptionsspektren, gelb: angepasstes Spektrum einer reinen TDI_{Gs}-Lösung. B: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm).

Im Zusammenhang mit dem TDI_{Gs} gab es Hinweise auf einen Energietransfer vom LHCII auf den Farbstoff. Bei der LHCII-Benetzung einer mit Farbstoff belegten TiO₂-Platte befand sich nach der Waschung mit Puffer ein großer Teil des TDI_{Gs} wie auch des LHCII im Waschüberstand. Diese LHCII-Farbstoff-Lösung zeigte im Vergleich zu einer gleichkonzentrierten reinen LHCII-Lösung eine deutlich geringere LHCII-Fluoreszenz

(Abb. 3.42). Dies könnte auf einen FRET zwischen LHCII und TDI_{Gs} zurückzuführen sein, da der Farbstoff hier in einem zehnfachen Überschuss vorliegt. Aufgrund der sehr niedrigen Fluoreszenzquantenausbeute von TDI_{Gs} (mündliche Mitteilung Glauco Battagliani) konnte ein möglicher FRET nicht weiter über Fluoreszenzspektroskopie untersucht werden.

Die oben beschriebenen Erkenntnisse motivierten dazu, die TiO₂-Platten der Firma Solaronix zu verwenden und eine Koadsorption von LHCII und dem Farbstoff auf diesen anzustreben. Da der Farbstoff in organischem Lösungsmittel gelöst wurde, sollte zunächst der Farbstoff separat auf die Platten aufgetragen werden und erst nach Abdampfen des Lösungsmittels der LHCII auf das TiO₂ gegeben werden. Dieser Vorgang funktionierte insofern gut, dass sowohl LHCII als auch TDI_{Gs} in gut sichtbaren Mengen auf der TiO₂-Oberfläche gebunden werden konnten (Abb. 3.43). Bei einer Benetzung mit LHCII von 2 mal 1 nmol/cm² konnte eine Belegungsdichte bis zu 0,6 nmol/cm² erreicht werden. Tendenziell konnte auf Platten mit vergleichsweise weniger Farbstoff

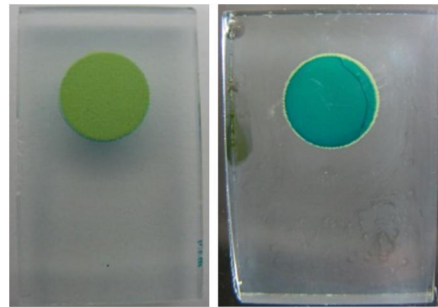


Abb. 3.43 Mit LHCII und TDI_{Gs} benetzte TiO₂-Platten der Firma Solaronix. Gezeigt ist eine TiO₂-Platte von oben (links) bzw. unten (rechts) nach der Belegung mit Farbstoff und LHCII.

mehr LHCII adsorbiert werden und umgekehrt (Daten nicht gezeigt). Allerdings war auch deutlich zu sehen, dass der (blaue) Farbstoff sich überwiegend in den unteren Schichten des TiO₂ einlagerte, während der LHCII, so schien es optisch, sich darüber einnistete. Die Aufnahme eines Emissionsspektrums von der Unterseite der Platte zeigte nach Anregung bei

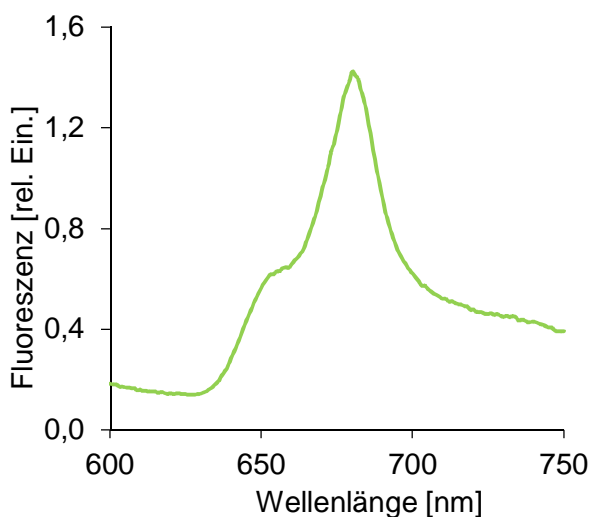


Abb. 3.44 LHCII-Fluoreszenz auf der Unterseite von mit Farbstoff belegten TiO₂-Platten. Emissionsspektrum ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) von der Unterseite einer TiO₂-Platte (Solaronix), die zuvor mit TDI_{Gs} und LHCII belegt wurde.

470 nm ein deutliches Chl *a*-Fluoreszenzsignal, so dass zumindest ein geringer Teil der LHCII-Trimere auch in die unteren Schichten der Platte gelangt sein musste (Abb. 3.44). Neben der Chl *a*-Fluoreszenz war auch eine deutliche Chl *b*-Schulter zu sehen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass ein Teil der Komplexe während der Beladungs- bzw. Waschprozedur auf den Platten teilweise zerfallen ist. Allerdings ist eine solche Chl *b*-Schulter auch schon im Zusammenhang mit einem effektiven Energietransfers auf einen Akzeptor beobachtet worden (vgl. Abb. 3.28).

Um die Funktionalität von Hybridkomplexen aus LHCII und TDI_{Gs} zu testen, wurden trotz der suboptimalen Verteilung von Protein und Farbstoff Wirkungsspektren aufgenommen. Dabei sollte überprüft werden, ob zumindest eine LHCII-sensibilisierte Ladungstrennung des TDI_{Gs}-Farbstoffes ausgemacht werden kann. Hierfür wurden die mit LHCII und TDI_{Gs} belegten TiO₂-Platten (=Anode) mit einer Elektrolytlösung aus 0,5 M KI und 0,04 M I₂ in Glycerin (Lion, 2005) versetzt, mit dem zugehörigen Glasdeckel der Firma Solaronix (entspricht der Anode) verschlossen und Wirkungsspektren aufgenommen (Abb. 3.45). Die Belegung der TiO₂-Platte mit purem Farbstoff führte nur zu einem geringen externen Quantenwirkungsgrad (EQE) von unter 0,2 %. In den Platten, die zusätzlich LHCII enthielten, war der Wirkungsgrad über den gesamten spektralen Bereich des sichtbaren Lichtes höher, außerdem konnten zwei Peaks bei ca. 450 und 680 nm mit EQE-Werten zwischen 0,3 und 0,9 % ausgemacht werden.

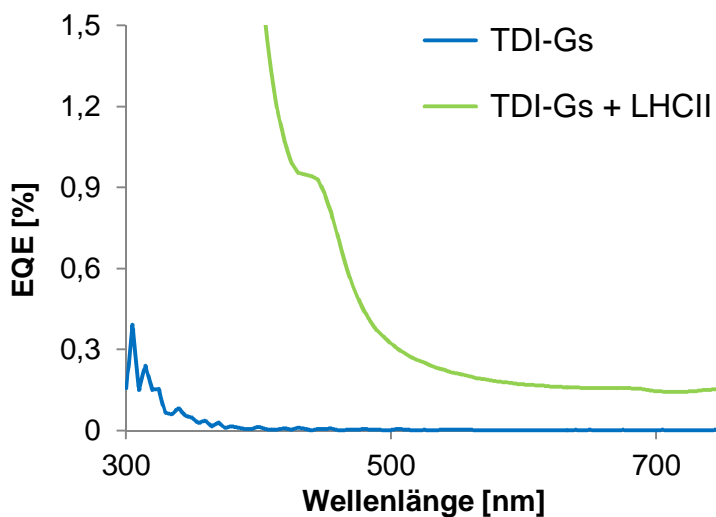


Abb. 3.45 Wirkungsspektrum von mit LHCII und TDI_{Gs} belegten TiO₂-Platten. Die TiO₂-Platten der Firma Solaronix wurden zunächst mit TDI_{Gs} und anschließend mit LHCII-Trimeren belegt (grün). Zum Vergleich diente eine Platte, die nur mit dem Farbstoff belegt wurde (blau). Die Wirkungsspektren wurden mit einer Elektrolytlösung aus 0,5 M KI und 0,04 M I₂ (in Glycerin) aufgenommen. Die Messungen wurden von Yanfei Zhao am MPI für Polymerforschung (AG Müllen) durchgeführt. Die Pfeile markieren zwei Peaks, die auf den LHCII zurückzuführen sein könnten (siehe Text).

3.8.3 LHCII-QD-Komplexe auf TiO₂-Platten

Wie der Terrylene-Farbstoff TDI_{Gs} sind auch die in dieser Arbeit häufig verwendeten Typ-II QDs zu einer Ladungstrennung befähigt. Daher lag es auf der Hand, auch Hybridkomplexe aus LHCII und QD in die TiO₂-Schichten leitfähiger FTO-Glasplatten zu integrieren.

Die Beladung der Solaronix-Platten mit einer wässrigen QD-Lösung führte auch nach mehrfachem Waschen zu einer deutlichen Braunfärbung (Abb. 3.46 A). Wurden jedoch QD in Hybridkomplexen mit LHCII in (natriumphosphathaltigem) *Standardpuffer* auf die Platten geladen, konnte nach den Waschschriffen kaum eine Grün- oder Braunfärbung dieser beobachtet werden (Abb. 3.46 B) und der Großteil des LHCII wurde im Waschüberstand wiedergefunden (Daten nicht gezeigt). Auch reiner LHCII in *Standardpuffer* konnte kaum auf der TiO₂-Schicht adsorbiert werden (Abb. 3.46 C). Im Vergleich dazu führt die Inkubation der Platten mit einer Tris/HCl-haltigen Pufferlösung zu einer deutlichen Grünfärbung der Lösung (Abb. 3.46 D).

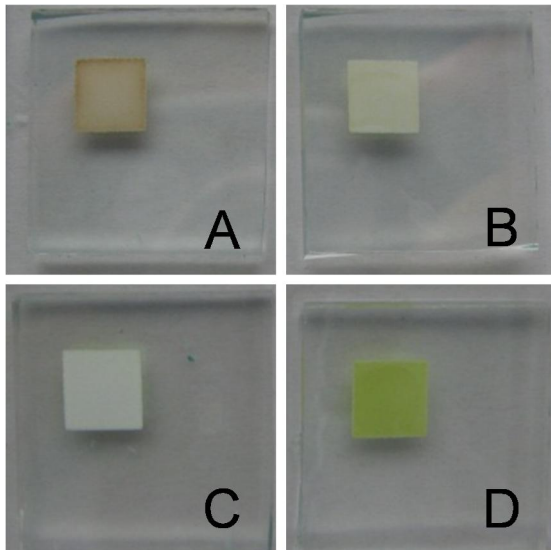


Abb. 3.46 Mit LHCII und QDs benetzte TiO_2 -Platten der Firma Solaronix. TiO_2 -Platten der Firma Solaronix nach Belegung mit QDs in Wasser (A), mit LHCII und QDs in NaP-Puffer (B), LHCII in NaP-Puffer (C) und LHCII in Tris-HCl-Puffer (D).

Aufgrund der geringen Belegungsichte der TiO_2 -Platten mit LHCII-QD-Hybridkomplexen wurde nur von der Platte mit reinen QD ein Wirkungsspektrum aufgenommen (Abb. 3.47). Auch hier wurde die Elektrolytlösung aus 0,5 M KI und 0,04 M I_2 in Glycerin verwendet (vgl. 3.8.2). Dabei zeigte sich eine EQE von bis zu 14 % im Bereich von 350 nm. Das Signal nahm mit zunehmenden Wellenlängen immer stärker ab und ähnelte im Verlauf dem Absorptionsspektrum der QDs. Das Wirkungsspektrum einer TiO_2 -Platte ohne QDs zeigte nur einer sehr schwache Elektroneninjektion im Bereich von 320 nm bei einem EQE-Wert weit unter 1 %.

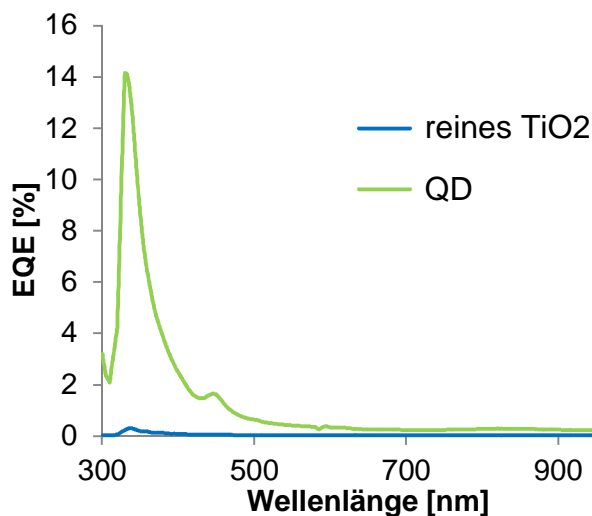


Abb. 3.47 Wirkungsspektrum von mit QDs belegten TiO_2 -Platten. TiO_2 -Platten der Firma Solaronix wurden mit CdTe/3xCdSe/ZnS-DHLA QDs belegt. Zum Vergleich dient das Wirkungsspektrum einer reinen TiO_2 -Platte. Die Spektren wurden mit einer Elektrolytlösung aus 0,5 M KI und 0,04 M I_2 (in Glycerin) aufgenommen. Die Messungen wurden von Yanfei Zhao am MPI für Polymerforschung (AG Müllen) durchgeführt.

3.9 Einschluss von LHCII in das Ringprotein Hcp1

Bei Hcp1 handelt es sich um ein wasserlösliches, selbstassemblierendes Protein aus sechs homologen Untereinheiten, die sich zu einer donatförmigen Ringstruktur zusammensetzen (Ballister, 2008). In Zusammenarbeit mit Andreas Schreiber (AG Schiller, Freiburg Institute of Advanced Studies (FRIAS)) sollte geschaut werden, ob es gelingt, den LHCII (bevorzugt in seiner trimeren Form) in eine solches Ringprotein zu integrieren. Neben dem Arbeiten in einer detergentfreien Lösung könnte der Vorteil eines solchen Hybridkomplexes in einer erhöhten temperaturabhängigen Stabilität liegen, da das Ringprotein bis zu einer Temperatur von 53°C

beständig ist (Schreiber, 2011). Durch das gezielte Einfügen von ein bzw. zwei Cysteinen in die Hcp1-Untereinheiten können diese zur Ausbildung einer röhrenförmigen Struktur mit definierter Länge bewegt werden (Ballister, 2008). Eine Funktionalisierung der jeweiligen Enden könnte dazu genutzt werden, z.B. LHCII-Moleküle und Farbstoffe bzw. Nanopartikel bei definierten Abständen spektroskopisch zu untersuchen.

Zunächst einmal galt es zu schauen, ob der LHCII in einen solchen hexameren Ringkomplex aus Hcp1-Monomeren integriert werden kann. Hierfür wurden $0,66 \mu\text{M}$ LHCII-Trimere mit Hcp1 in verschiedenen Verhältnissen gemischt (Verhältnis von LHCII-Monomere zu Hcp1-Monomeren 2, 8 bzw. 24). Außerdem wurde ein Vergleichsansatz aus LHCII und Rinderserumalbumin (BSA) in gleichen Verhältnissen angesetzt. BSA ist wie Hcp1 ebenfalls ein wasserlösliches Protein, es bildet jedoch keine Ringstrukturen aus. Als Kontrolle diente eine gleichkonzentrierte LHCII-Probe in Puffer. Alle Proben wurden in einem Puffer mit einer Endkonzentration $12,5 \text{ mM}$ Tris/HCl pH 7.5 und 125 mM NaCl angesetzt, da diese Bedingungen für Hcp1 nötig waren, um die Ringstrukturen auszubilden. Die Salzkonzentrationen stellten für den LHCII kein Problem dar. Es wurde jedoch darauf geachtet, dass die Endkonzentration an LM in den Proben (einheitlich) nicht unter $0,05 \%$ lag.

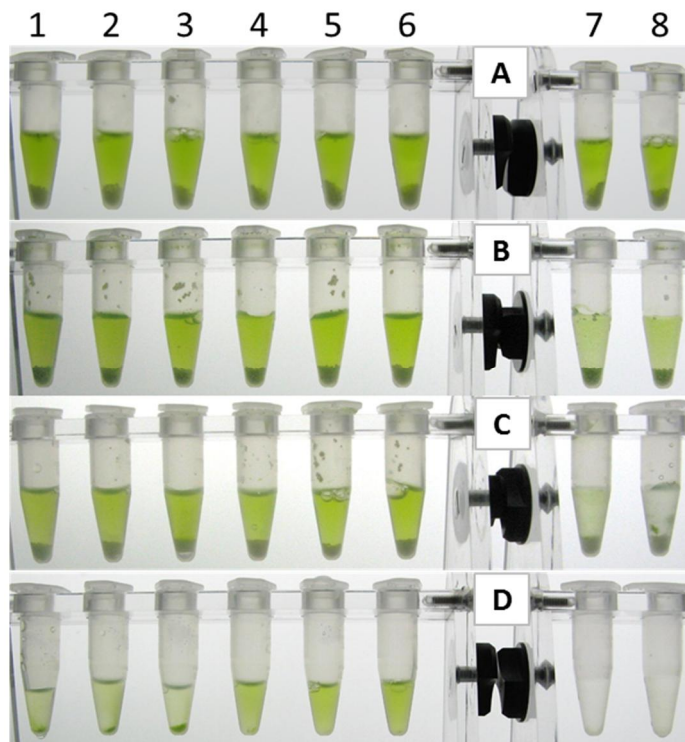
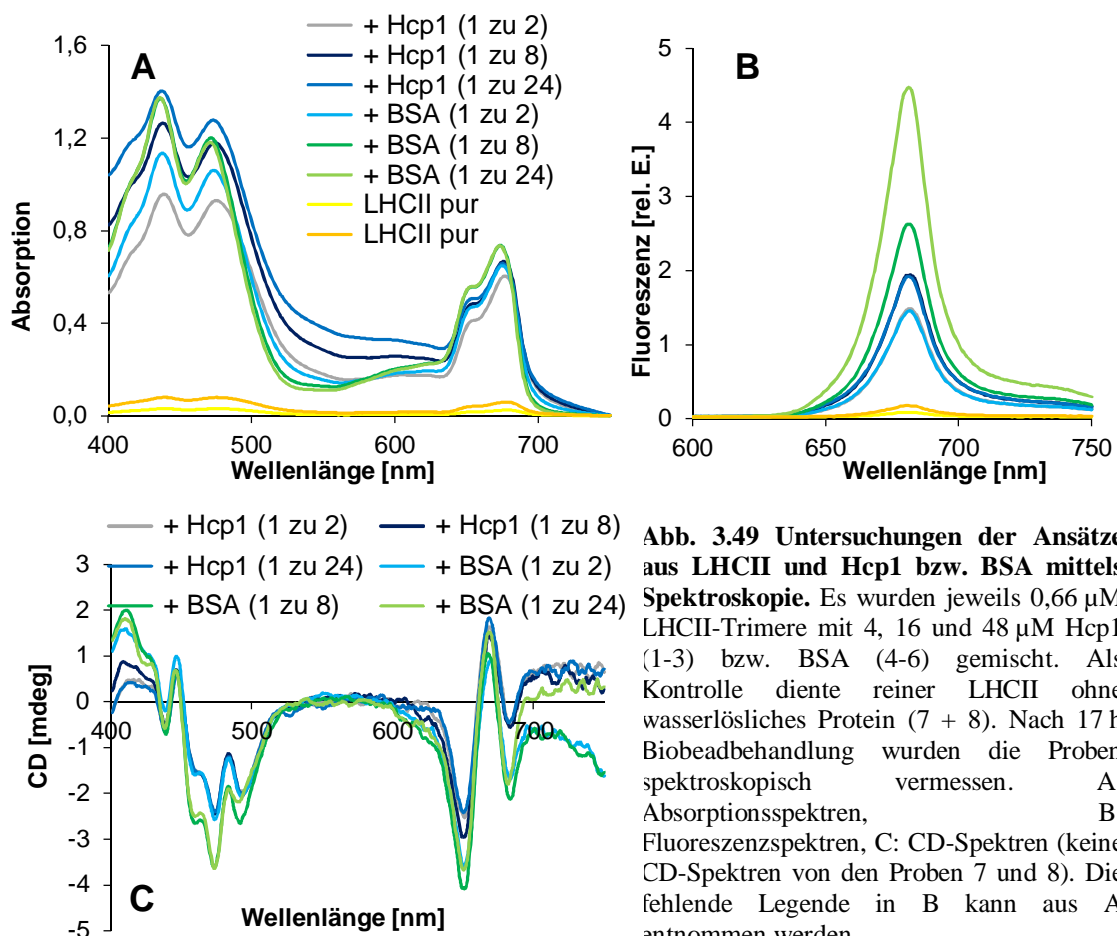


Abb. 3.48 Versuch zur Integration des LHCII in Hcp1-Ringprotein. Es wurden jeweils $0,66 \mu\text{M}$ LHCII-Trimere mit 4 , 16 und $48 \mu\text{M}$ Hcp1 (1-3) bzw. BSA (4-6) gemischt und mit jeweils 30 - 40 mg Biobeads bei 4°C und 60 rpm rotiert. Als Kontrolle diente LHCII ohne weitere Proteinzugabe (7 + 8). Proben vor (A), nach 2 h (B) und nach 17 h (C) Inkubation mit Biobeads. Proben wurden nach der Biobeadbehandlung für 2 Tage auf Eis gelagert (D).

Die Idee war, durch langsamen Entzug des Detergenz den LHCII in das Ringprotein Hcp1 zu drängen. Hierfür wurden alle Proben mit 30 - 40 mg Biobeads (Biorad) versetzt und auf einem Drehrad bei 60 Upm und 4°C inkubiert. Nach jeweils 2 und 12 h wurden die Biobeads ausgetauscht. Die Grünfärbung der Proben wurde vor bzw. nach 2 und 17 h der Biobeads-

Behandlung sowie nach einer anschließenden Inkubation auf Eis über 3 Tage mittels Fotoaufnahmen dokumentiert (Abb. 3.48).

Durch die Zugabe der Biobeads wurde nach und nach den Proben das Detergenz entzogen, was sich in einer Entfärbung der Kontrollproben (Abb. 3.48, Proben 7 und 8) bemerkbar machte. Diese Entfärbung ist auf den Zerfall der LHCII-Komplexe zurückzuführen, wobei das farbgebende Chlorophyll frei wird und in der wässrigen Lösung sofort aggregiert. In den Ansätzen mit Hcp1 (1-3) bzw. BSA (4-6) war keine vollständige Entfärbung der Lösung zu beobachten, jedoch nahm die Grünfärbung mit der Zeit gegenüber den Ausgangsproben ab. Nach einer 3-tägigen Lagerung der mit Biobeads behandelten Proben auf Eis konnte in den mit Hcp1-versetzten Proben eine deutliche Abnahme der Grünfärbung und gleichzeitig das Auftreten von grünen Chlorophyll-Aggregaten beobachtet werden. Nach der 17-stündigen Biobeads-Inkubation wurden von allen Proben Absorptions-, CD und Fluoreszenzspektren aufgenommen (Abb. 3.49). Während die Absorptionsspektren aller Proben (mit Ausnahme der Kontrollproben 7 und 8) auf relativ gleiche Mengen an Chlorophyll hinwiesen (Abb. 3.49A), waren die Fluoreszenzintensitäten doch recht unterschiedlich (Abb. 3.49B).



Tendenziell fluoreszierten die Proben mit mehr wasserlöslichem Protein in der Lösung intensiver, wobei dieser Effekt bei BSA größer war als bei Hcp1. Die Kontrollen ohne

wasserlösliches Protein zeigten sowohl eine relativ niedrige Absorption wie Fluoreszenz. Insgesamt fiel auf, dass keines der Fluoreszenzspektren eine sogenannte Chlorophyll *b*-Schulter aufwies. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass freie Chlorophylle in der detergentzfreien Lösung sofort aggregierten. Während die LHCII-Konzentration in den Kontrollproben nicht mehr ausreichte, um CD-Spektren aufzunehmen, zeigten alle LHCII-Proben, die mit wasserlöslichem Protein versetzt wurden, die typischen CD-Signale von LHCII-Trimeren. Eine auffällige Veränderung in den CD-Spektren der detergentzfreien LHCII-Proben ist das geringe Signal des negativen Peak bei 680 nm (vgl. dazu Abb. 3.12).

3.10 LHCII und Lanthanoide

Lanthanoide sind Metalle, die Zellmembranen passieren können und über eine vergleichsweise lange Fluoreszenzlebensdauer verfügen. Diese Eigenschaften machen Lanthanoide wie z.B. Europium oder Terbium besonders für eine spezifische Markierung des LHCII in vivo interessant (vgl. 1.4.2.3). Wanowska (2012) hat im Rahmen ihrer Diplomarbeit zunächst einmal versucht, die Lanthanoide Eu^{3+} und Tb^{3+} an rekombinant hergestellten LHCII zu koppeln. Dabei wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen sollten die Lanthanoide in Form einer Maleimid-funktionalisierten Struktur über Cysteine kovalent gebunden werden und zum anderen sollte das LHCII-Apoprotein mit einer Terbium-Affinitätssequenz versehen werden, damit die Lanthanoide direkt mit dem Protein interagieren können. Aufgrund der spektroskopischen Eigenschaften, genauer gesagt der spektralen Überlappung der Eu^{3+} - bzw. Tb^{3+} -Emission mit der LHCII-Absorption, ist ein Lumineszenz-Energietransfer durchaus möglich (Abb. 3.50).

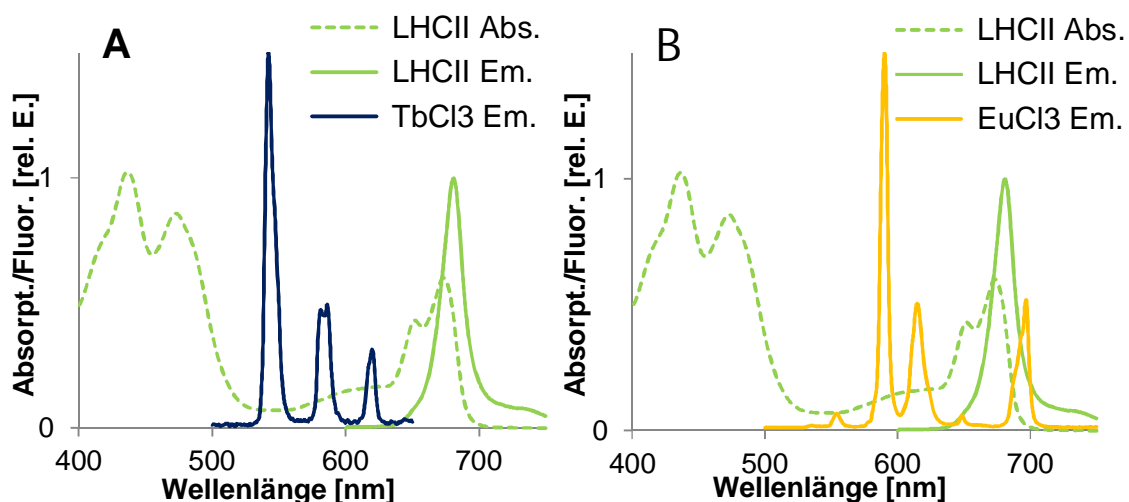


Abb. 3.50 Spektrale Überlappung der Lanthanoid-Emission mit der LHCII-Absorption bzw. LHCII-Emission. Die Chlorid-Salze wurden in Wasser gelöst. Alle Spektren sind normiert. A: Terbium. B: Europium.

Während sich die Emission von Terbium und LHCII nicht überlagern und somit ein Energietransfer einfach zu detektieren sein sollte (Abb. 3.50 A), könnte die Untersuchung des Energietransfer zwischen Europium und LHCII aufgrund der spektralen Überlappung beider Fluoreszenzspektren erschwert werden (Abb. 3.50 B). Ein Absorptionsspektrum der Lanthanoide konnte aufgrund der extrem niedrigen Extinktionskoeffizienten nicht aufgenommen werden, aber die Aufnahme von Anregungsspektren zeigte, dass es keine Überlappung der LHCII-Emission und der Lanthanoid-Absorption gab (Daten nicht gezeigt). Somit war auch kein ungewollter Rücktransfer der Energie vom LHCII auf die Lanthanoide zu erwarten.

3.10.1 Energietransfer zwischen Lanthanoid-bindenden, Maleimid-funktionalisierten Strukturen und LHCII

Die Markierung von rekombinantem LHCII mit Maleimid-funktionalisierten Farbstoffen ist ein gängiges Verfahren (Gundlach, 2009; Lauterbach, 2010; Werwie, 2012). Aus diesem Grund wurden für die ersten Versuche Maleimid-Farbstoffe trFluorTMTb- (Tb-Mal) und trFluorTMEu-Maleimid (Eu-Mal) der Firma Biomol verwendet, die Terbium bzw. Europium über einen patentierten Mechanismus komplexieren.

Für die Markierung wurden zwei verschiedenen LHCII-Varianten ausgewählt: der S3Ch und der 4xCh. Während der S3Ch über ein Cystein an Position 3 und einen C-terminalen His₆-Tag verfügt, besitzt der 4xCh zudem noch drei weitere Cysteine an den Positionen 106, 160 und 223. Die Markierung mit den Eu- bzw. Tb-Mal wurde an den S3Ch- bzw. 4xCh-Trimeren durchgeführt, dabei wurde immer ein zehnfacher Farbstoff-Überschuss pro Cystein gewählt (vgl. 2.4.8.1). Im Anschluss an die Markierungsreaktion wurden aus den entsprechenden Proben die Saccharose über Centricons und der überschüssige nicht gebundene Farbstoff über einen Ultrazentrifugationsschritt entfernt (vgl. 2.4.6). Eine direkte Bestimmung der Markierungseffizienz über Absorptionsspektroskopie war aufgrund der niedrigen Extinktionskoeffizienten der Lanthanoid-Maleimide nicht möglich.

Um den Lumineszenz-Energietransfer in den markierten LHCII-Proben zu untersuchen, wurden die Komplexe bei 331 nm, dem Absorptionsmaximum der Lanthanid-Maleimide, angeregt und nach einer Ruhezeit von 100 μ s Emissionsspektren aufgenommen. Zum Vergleich wurden auch die entsprechenden Spektren der unmarkierten LHCII-Varianten gemessen (Abb. 3.51).

Das Emissionsspektrum der Tb-Maleimid markierten Einfachcysteinmutante (S3Ch) zeigt neben einer schwachen Tb-Emission auch ein LHCII-Fluoreszenzsignal bei 680 nm (Abb. 3.51 A). Dieses Signal fehlt zwar in der reinen Farbstoffprobe, jedoch erscheint es in der reinen LHCII-Probe mit nahezu gleicher Intensität. So kann zwar von einer Markierung des S3Ch mit dem Tb-Maleimid ausgegangen werden, einen Energietransfer vom Tb-Mal auf den LHCII

konnte man jedoch nicht ausmachen. Im Gegensatz dazu konnte beim Tb-markierten 4xCh eine Zunahme der LHCII-Fluoreszenz im Vergleich zu unmarkiertem 4xCh verzeichnet werden (Abb. 3.51 B).

In Eu-Maleimid markierten Komplexen ist die Analyse der LHCII-Fluoreszenz etwas schwieriger, da sich die Emissionsspektren von LHCII und Eu überschneiden. Dennoch konnte sowohl in den Fluoreszenzspektren des Eu-Mal markierten S3Ch wie auch des markierten 4xCh im Vergleich zu den jeweils angepassten Farbstoffspektren eine Veränderung der Emission bei 680 nm beobachtet werden (Abb. 3.51 C bzw. D).

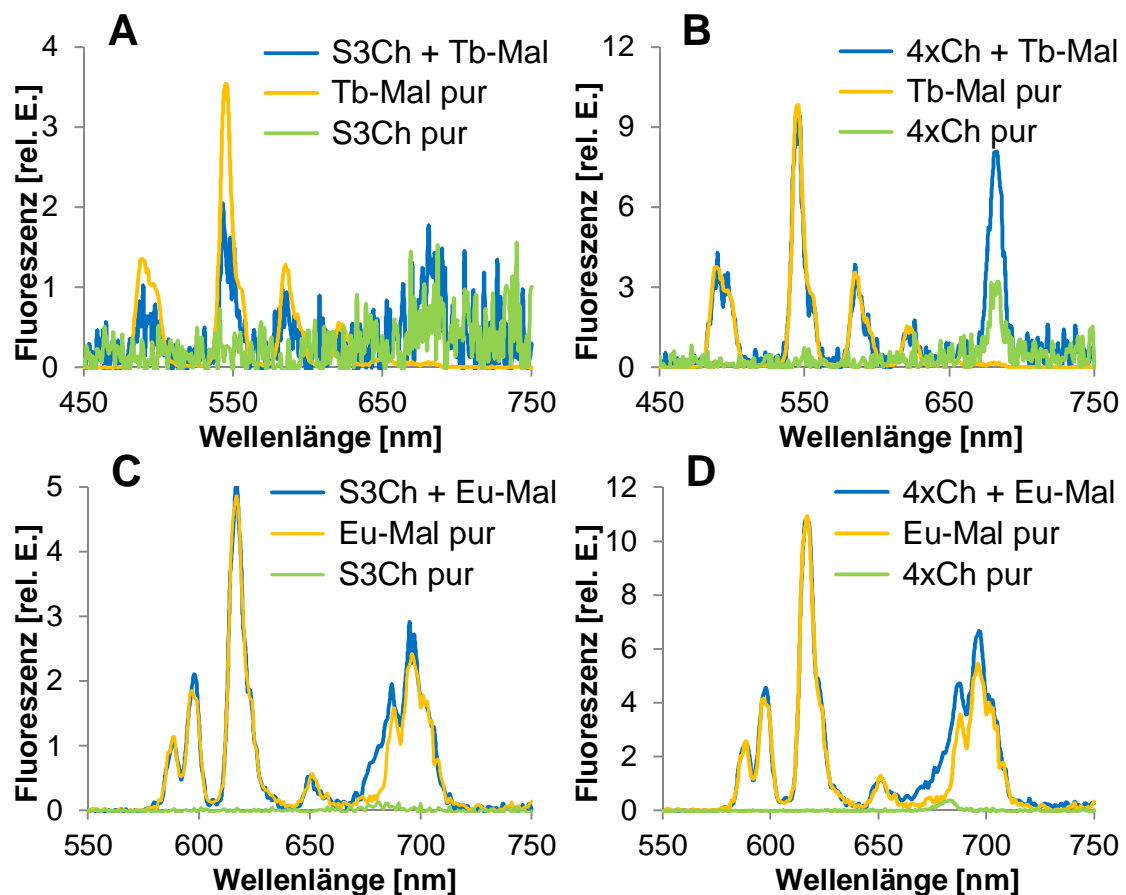


Abb. 3.51 Fluoreszenzspektren von mit Lanthanoid-Maleimid markierten und unmarkierten LHCII-Trimeren. Die Spektren wurden nach Anregung bei 331 nm und anschließender Ruhezeit von 100 μ s aufgenommen. Die reinen Farbstoffspektren wurden an die Farbstoff-Emission in den Hybridkomplexen angepasst. Die Konzentration des LHCII betrug jeweils 0,65 μ M. A: S3Ch mit Tb-Maleimid. B: 4xCh mit TB-Maleimid. C: S3Ch mit Eu-Maleimid. D: 4xCh mit Eu-Maleimid.

3.10.2 Energietransfer zwischen Lanthanoiden und LHCII mit einer Lanthanoid-Affinitätssequenz

Die Herstellung und Charakterisierung der LHCII-Variante mit einer Tb-Affinitätssequenz (Tb-C79Sh) wurde erfolgreich durchgeführt (Wanowska, 2012). Man spricht allgemein bei solchen Affinitätssequenzen für Lanthanoide von *Lanthanide binding tags* (LBTs). Es konnte kein negativer Einfluss der eingefügten Peptid-Sequenz auf die Trimerisierungsfähigkeit des

LHCII festgestellt werden. Die 20 AS lange Peptidsequenz (FIDTNN DGWIEGDELLLEEG) wurde basierend auf einer Calcium-Bindedomäne entwickelt und durch den Austausch mehrerer AS eine Terbium-Affinität mit einer Dissoziationskonstante von $K_D = 19$ nM erzielt. Diese ist vergleichbar mit Affinitäten ganzer Calcium-Bindeproteine zu Calcium (Martin, 2005). Das Tryptophan in der Mitte der Sequenz übernimmt die entscheidende Rolle einer Antenne. Nach Anregung bei 280 nm kann dieses seine Anregungsenergie nach dem Dexter-Mechanismus auf das Terbium übertragen.

Die Markierungsversuche sollten sowohl mit Terbium-Chlorid ($TbCl_3$) als auch Europium-Chlorid ($EuCl_3$) durchgeführt werden. Da sich die $TbCl_3$ -Lösung als zu alt und somit unbrauchbar herausstellte, konnten die Versuche aus zeitlichen Gründen zunächst nur mit $EuCl_3$ umgesetzt werden. Für die Markierung wurde in dH_2O gelöstes $EuCl_3$ zur LHCII-Trimeren in einem fünffachen Überschuss dazugegeben. Um das überschüssige, nicht gebundene Terbium zu entfernen, wurden die Proben über einen Ultrazentrifugationsschritt aufgereinigt. Dieser Markierungsvorgang wurde neben dem Tb-C79Sh auch mit C79Sh als Referenz durchgeführt. Für die Energietransfer-Messungen wurden jeweils $0,4 \mu M$ der aufgereinigten Komplexe bei 280 nm (Absorptionsmaximum des in der Tb-Affinitätssequenz enthaltenen Tryptophan) angeregt und nach einer Ruhezeit von $100 \mu s$ Emissionsspektren aufgenommen (Abb. 3.52).

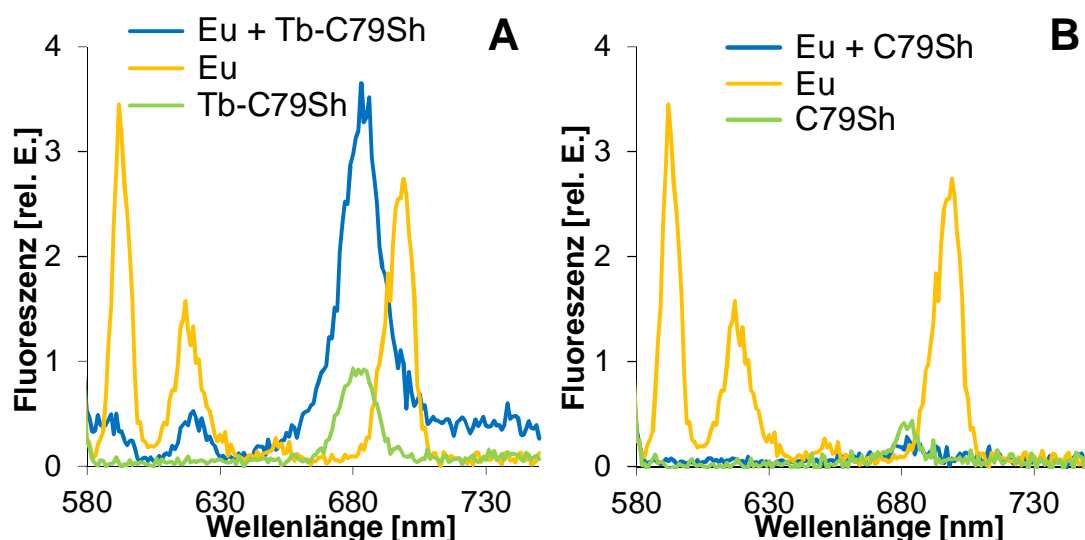


Abb. 3.52 Untersuchung des Energietransfers zwischen Europium und LHCII mit und ohne einer Tb-Affinitätssequenz. Die markierten Proben wurden vor der Messung über Ultrazentrifugation aufgereinigt. Die Spektren wurden nach Anregung bei 280 nm und anschließender Ruhezeit von $100 \mu s$ aufgenommen. Die Konzentration des reinen $EuCl_3$ beträgt $8,5 \mu M$, das Spektrum dient als Orientierung. Die Konzentration des LHCII betrug jeweils $0,9 \mu M$. A: $EuCl_3$ mit Tb-C79Sh. B: $EuCl_3$ mit C79Sh (Referenz).

Das Spektrum einer $8,5 \mu M$ $TbCl_3$ -Lösung diente als Orientierung, um die Emissionsmaxima richtig zuzuordnen zu können. Da die Platte, in der die Messungen stattfanden, nach Anregung bei 280 nm eine starke Eigenfluoreszenz um 550 nm zeigte, wurden die Spektren erst ab 580 nm ausgewertet.

Das Emissionsspektrum des markierten Tb-C79Sh zeigte neben zwei Peaks im Bereich von 560 und 630 nm, die dem Europium zugeordnet werden konnten, einen weiteren Peak bei 680 nm, der auf den LHCII zurückgeführt wurde (Abb. 3.52 A). Aufgrund der Überlappung der Emissionsspektren vom LHCII und Eu im Bereich von 700 nm konnte das Europium-Signal bei 700 nm nicht eindeutig ausgemacht werden. Im Vergleich zur reinen Tb-C79Sh-Emission, war das LHCII-Signal in der Probe mit Eu deutlich ausgeprägter. In der Referenzprobe mit C79Sh konnte nach der Anregung bei 280 nm und 100 μ s keine Eu^{3+} -Emission ausgemacht werden (Abb. 3.52 B). Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Europium nicht an den C79Sh binden konnte und somit während des Aufreinigungsschritts durch Ultrazentrifugation vom LHCII getrennt wurde.

4. Diskussion

4.1 Quantum Dots

4.1.1 TCaEP interagiert mit der QD-Oberfläche und stabilisiert die QD-Emission

Die Untersuchung der verschiedenen Typ-I bzw. später auch der Typ-II QDs über Fluoreszenzspektroskopie gestaltete sich zu Beginn dieser Arbeit aufgrund von stark schwankenden Fluoreszenzemissionen als besonders schwierig (vgl. 3.1 + 3.2.2). Als eine Möglichkeit für die instabile Fluoreszenz von Quantum Dots in wässriger Lösung wurde die zeitabhängige Oxidation der Liponsäure-Liganden in Betracht gezogen. Die Versuche zur Stabilisierung der QDs durch Zugabe von Reduktionsmittel zielten daher zunächst darauf ab, unter Umständen oxidierte SH-Gruppen der Liponsäure wieder zu reduzieren und somit wieder für eine Bindung an die QDs bereitzustellen. Unter diesen Umständen wäre zu erwarten gewesen, dass abweichende Einflüsse auf die QD-Fluoreszenz durch verschiedene Reduktionsmittel in einem Zusammenhang mit deren Reduktionskraft stehen. D.h. je größer die Reduktionskraft, desto mehr Liganden werden reduziert, die sich wieder an QDs anlagern und somit die Fluoreszenz beeinflussen können.

Betrachtet man die Ergebnisse dieses Versuchsabschnittes, so fällt auf, dass die beiden Reduktionsmittel Triscyanoethylphosphin (TCyEP) und Triscarboxyethylphosphin (TCaEP) sich trotz ihrer ähnlichen Struktur deutlich unterschiedlich auf die QD-Fluoreszenz auswirken (vgl. Abb. 3.2). Es ist zunächst einmal nicht davon auszugehen, dass die Reduktionskraft dieser beiden Stoffe gravierend unterschiedlich ist. Dennoch führt TCaEP zu einer massiven Verstärkung der Fluoreszenz, wohingegen der Einfluss von TCyEP im Vergleich deutlich geringer ausfällt. Hinzu kommt, dass Phosphine wie TCyEP und TCaEP im Vergleich zu DTT als stärkere Reduktionsmittel gelten (Cline, 2004). TCyEP und DTT scheinen aber einen vergleichbaren Effekt auf die QD-Fluoreszenz zu haben (vgl. Abb. 3.2). Außerdem konnte kein signifikanter Unterschied in der Intensität des Fluoreszenzsignals ausgemacht werden, nachdem oxidiertes bzw. frisches TCaEP zu den QDs gegeben wurde (vgl. Abb. 3.8). Wäre die Reduktionskraft der entscheidende Faktor, würde man erwarten, dass jenes TCaEP, welches nach intensiver Behandlung mit Luft überwiegend im oxidierten Zustand vorliegen sollte, zu einer weniger starken Intensivierung des Fluoreszenzsignals führt. Es liegt daher nahe, andere Erklärungen als allein die Reduktionskraft der Reduktionsmittel für die Stabilisierung der QD-Fluoreszenz heranzuziehen.

Phosphine werden interessanterweise im Zusammenhang mit Quantum Dots regelmäßig als Liganden eingesetzt (Dabbousi, 1997; Kim, 2003; Fischer, 2012). Sie binden an die metallische Oberfläche der QDs, und wenn sie im Überschuss hinzugegeben werden, passivieren sie die QD-Oberfläche und stabilisieren somit die Fluoreszenz der QDs. Im Gegensatz zu Liganden mit

Thiolgruppen nimmt dabei jedoch die Quantenausbeute von CdSe/6xZnS-QDs nicht ab (Kim, 2003; Breus, 2007). Dass der beschriebene Effekt auf die QD-Emission letztlich nur bei TCaEP deutlich auftritt und so nicht bei TCyEP zu beobachten ist, könnte daran liegen, dass TCaEP aufgrund seiner drei Carboxylgruppen hydrophiler ist als TCyEP mit seinen drei Cyanogruppen, und somit die QDs verstärkt in Lösung hält. Es ist zunächst einmal nicht von der Hand zu weisen, dass die unterschiedliche Wirkung der beiden Moleküle auch auf eine direkte Interaktion der Carboxylgruppen mit der QD-Oberfläche zurückzuführen sein könnte. Jedoch führte die Zugabe von EDTA zu den QDs nicht zu einer signifikanten Erhöhung bzw. Stabilisierung der QD-Fluoreszenz (vgl. Abb. 3.8). EDTA verfügt sogar über vier Carboxylgruppen, daher ist nicht anzunehmen, dass der stabilisierende Effekt von TCaEP auf diese Gruppen zurückzuführen ist.

Auch die Erkenntnis, dass der Einfluss auf die QD-Fluoreszenz unabhängig vom Redoxzustand des TCaEP zu sein scheint, also unabhängig davon, ob ein Phosphin oder ein Phosphinoxid vorliegt, spricht nicht gegen eine direkte Interaktion von TCaEP mit der QD-Oberfläche. TOPO (Trioctylphosphinoxid) wird als (Ausgangs)-Ligand für Quantum Dots in organischem Lösungsmittel verwendet (Dabbousi, 1997; Mntungwa, 2012). Wie der Name schon verrät, handelt es sich dabei um ein Phosphinoxid. Es interagiert mit der QD-Oberfläche und es wäre sogar denkbar, dass auch TCaEP nur in seinem oxidierten Zustand an die QD-Oberfläche bindet. Gibt man TCaEP in eine wässrige QD-Lösung, findet es mit Sicherheit ausreichend freie Liganden, die in oxidiertem Zustand vorliegen. Nach deren Reduktion läge TCaEP als Phosphinoxid vor und könnte an die QD-Oberfläche binden. Für diese Theorie spricht auch die Tatsache, dass es nicht gelang, QDs mit Hilfe von (reduziertem) TCaEP aus organischem Lösungsmittel in eine wässrige Phase zu überführen (mündliche Mitteilung Xianxing Xu und Vladimir Breus, AG Prof. Dr. Thomas Basché, Institut für Physikalische Chemie). Sollte dieser Phasentransfer jedoch auch nicht mit dem entsprechenden Phosphinoxid gelingen, könnte dies auch bedeuten, dass es sich um eine schwache Bindung zwischen TCaEP und QD handelt, die nicht für einen Phasentransfer aus organischem Lösungsmittel in eine wässrige Phase ausreicht. Außerdem wurde in der Regel in organischem Lösungsmittel TOPO als Ligand verwendet, daher ist es fraglich, ob dieser Phosphinoxid-Ligand beim Versuch eines Phasentransfers durch einen anderen Phosphinoxid-Liganden auch tatsächlich verdrängt werden kann.

Der stabilisierende Effekt von TCaEP auf die QD-Fluoreszenz kann durch eine Anlagerung an die QD-Oberfläche durchaus nachvollzogen werden. Dass TCaEP aber insbesondere auch einen positiven Einfluss auf die Quantenausbeute des QDs hat, ließ sich besonders gut an der Versuchsreihe mit den Typ-II QDs beobachten (vgl. 3.2). Hier konnte man sehen, dass die Zugabe von frischer DHLA zu einer QD-Lösung zwar schon zu einer zeitlich begrenzten Erhöhung der Fluoreszenz führte, jedoch wurde dieser Effekt nach der Zugaben von TCaEP

noch einmal deutlich verstärkt. Eck (2009) beschreibt in ihrer Diplom-Arbeit, dass Natrium-Phosphat-Puffer einen stark fluoreszenzlöschenden Einfluss auf die Fluoreszenz der Nanopartikel hat. Der steigernde Effekt von TCaEP auf die QD-Emission könnte daher auch so erklärt werden, dass es durch seine Bindung in Freiräumen zwischen der Liponsäure die Anlagerung von Phosphat-Ionen oder anderen Molekülen mit fluoreszenzlöschenden Eigenschaften an die QD-Oberfläche verhindert. Diese Vermutung wird durch die oben erwähnten Untersuchungen bestärkt. Es scheint, dass die Liponsäure zunächst einmal die zur Aggregation tendierenden QDs in Lösung hält. Im Vergleich zu QDs mit extra DHLA in dH₂O (also ohne NaP-Puffer) wird die Fluoreszenzintensität in NaP im Lauf der Zeit doch deutlich schwächer. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass mit der Zeit immer mehr Phosphat-Ionen mit der QD-Oberfläche in Kontakt kommen. Wird dagegen TCaEP gleichzeitig mit der DHLA zu der QD-Lösung gegeben, wird dieser Prozess verhindert und die hohe Fluoreszenzquantenausbeute deutlich über einen längeren Zeitraum stabilisiert. So kann auch erklärt werden, dass eine höhere QD-Fluoreszenz in der QD-Probe mit DHLA und TCaEP erzielt wurde als in der Probe, die nur TCaEP enthielt.

Insgesamt scheinen den mit der QD-Oberfläche interagierenden TCaEP-Molekülen mehrere Funktionen zuzukommen. Neben der bereits erwähnten Abschirmung der QDs von Molekülen mit fluoreszenzlöschenden Eigenschaften könnte das TCaEP aufgrund seiner negativen Ladungen einen unterstützenden wasserlöslichen Effekt haben. Entscheidend könnte auch sein, dass aufgrund der Nähe des Reduktionsmittels zur gebundenen Liponsäure eine photokatalytische Oxidation der Liganden verhindert wird. So wird auf längere Zeit eine Aggregation der QDs verhindert. Da für einen Phasentransfer bei der Herstellung von wasserlöslichen QDs DHLA oder ein anderer Ligand notwendig ist und TCaEP alleine dazu nicht in der Lage ist, scheint die Kombination aus TCaEP und DHLA im Umgang mit den QDs am sinnvollsten zu sein. Im Umkehrschluss bedeutet dies aber auch, dass eine nicht mehr frische QD-Charge vor Verwendung noch einmal mit reduzierter DHLA versetzt werden sollte. Dies hat sich auch bei der Wiederaufbereitung von QD-Stammlösungen bewährt (vgl. 3.3.2). Auf eine direkte Zugabe von TCaEP zur wiederaufbereiteten Stammlösung kann verzichtet werden, da zum einen sich dieses Vorgehen bewährt hatte, so dass eine weitere Änderung des Protokolls an der Stelle nicht notwendig erscheint, und zum anderen nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob TCaEP nicht doch auch in seinem reduzierten (also frischen) Zustand für die Stabilität notwendig ist. Eine längere Lagerung des TCaEP in wässriger Lösung würde zu dessen Oxidation führen.

4.1.2 Die Zukunft von TCaEP in QD-Versuchen

Der Einsatz von TCaEP im Zusammenhang mit CdSe/6xZnS/DHLA-QDs bzw. CdTe/3xCdSe/ZnS/DHLA-QDs hat sich bewährt. Es war nun möglich, Energietransferuntersuchungen in Hybridkomplexen aus QDs und LHCII durchzuführen. Denn

erst eine stabile QD-Fluoreszenz erlaubte es, die Fluoreszenzlöschung der Typ-I QDs bzw. den sensibilisierten Akzeptorzuwachs der Typ-II QDs zur Untersuchung des Energietransfers heranzuziehen. Versuche von Breus und Xu haben gezeigt, dass sich TCaEP alleine als Ligand nicht eignet, um die Nanopartikel in Lösung zu bringen. Aber auch in Kombination mit Liponsäure bindet TCaEP als einzähniger „Hilfsligand“ nicht besonders stabil an die QD-Oberfläche und muss daher in einem sehr hohen Überschuss zur QD-Lösung hinzugegeben werden (Kim, 2003). Es kann jedoch durchaus auch ein Vorteil von ein- oder zweizähnigen Liganden sein, dass sie sich von möglichen Interaktionspartnern der QDs wie z.B. des LHCII verdrängen lassen, so dass eine Bindung an die ZnS-Oberfläche der QDs erleichtert wird. TCaEP ist aber auch eine dreifache Säure, dass heißt insbesondere bei einem hohen Überschuss muss für einen stabilen pH die Pufferkonzentration ebenfalls erhöht werden. Hinzu kommt, dass Phosphine sehr reaktionsfähig sind und z.B. mit Natriumboratpuffer zu einem absorbierenden Produkt reagieren. Diese zusätzliche Absorption stört wiederum einen Vergleich verschiedener QD-Proben über Absorptionsmessungen. Es hat sich auch gezeigt, dass die Anwesenheit von TCaEP als Reduktionsmittel ungünstig sein kann. So konnte z.B. bei der Herstellung von Hybridkomplexen aus LHCII, organischen Farbstoffen (z.B. Alexa₇₅₀-Mal) und QDs nachgewiesen werden, dass TCaEP manche Farbstoffe zerstört (vgl. Abb. 3.27).

Eine Alternative zum TCaEP könnte der Einsatz von Oligophosphinen sein (Kim, 2003). Diese sind untereinander vernetzt und lagern sich dadurch, im Gegensatz zu einzähnigen Liganden, stabil an die QD-Oberfläche. Sie müssen daher nicht in einem hohen Überschuss zur Lösung hinzugefügt werden. Außerdem besteht die Möglichkeit an solche Oligophosphine auch andere funktionelle Gruppen anstelle von Carboxylgruppen einzufügen. Somit wäre es nicht mehr zwingend notwendig, im leicht basischen pH-Bereich zu arbeiten. Inwiefern die Interaktion z.B. eines His₆-Tag oder eines Tetracysteinmotivs mit dem ZnS durch eine vernetzte, stabilere Ligandenhülle beeinflusst wird, kann an dieser Stelle nicht genau beurteilt werden.

Eine entscheidende Weiterentwicklung der LHCII-QD-Hybridkomplexe wäre die Einbettung der QDs in eine Lipiddoppelschicht, in die wiederum ein oder mehrere LHCII-Trimere, dem nativen Zustand nachempfunden, inseriert werden könnten. Ein Verfahren zur Integration von QDs in Liposomen z.B. aus DPPG ist bereits beschrieben worden (Chen, 2006). DPPG-Liposomen eignen sich auch zur Insertion des LHCII (Reinsberg, 2000). Jedoch werden bei diesem Verfahren nach Chen (2006) mehrere QDs in die Liposomenvesikel integriert und nicht die einzelnen QDs in eine Lipiddoppelschicht eingehüllt. Ein vielversprechender Ansatz zur Präparation von QDs mit einer der Lipiddoppelschicht ähnlichen Struktur wird von Dang et al. (2012) beschrieben. Hier wird die Wasserlöslichkeit der QDs dadurch erzielt, dass an die Liganden (Trioctyl-Phosphin-Oxid, TOPO), die den QD im organischen Lösungsmittel halten, Phosphocholine geknüpft werden, so dass der QD von einer einfachen Lipidschicht umgeben

wird, in der die polaren Köpfchen nach außen gerichtet sind. Da der LHCII nicht in Phosphatidylcholine inseriert werden kann (Boggasch, 2006), müsste ein anderes Lipid wie z.B. POPG (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-glycerol-3-(Phospho-rac) 1-glycerol) oder DPPG gewählt werden. Ob sich diese Lipide für ein solches Verfahren eignen, müsste schlicht und einfach ausprobiert werden. Überschüssige Lipid-Moleküle können über einen Zentrifugationsschritt entfernt werden. Damit der LHCII ausreichend Platz zur Insertion in die QD-Hülle hat, sollte der primäre Ligand an der QD-Oberfläche zumindest über ausreichend lange Alkylketten verfügen, so dass der Durchmesser einer Lipiddoppelschicht erreicht werden kann. Eine Möglichkeit könnte das im Vergleich zum TOPO längerkettige Trihexadecyl-Phosphin-Oxid sein. Es verfügt wie das DPPG über Alkylketten mit 16 Kohlenstoffatomen, jedoch in dreifacher statt zweifacher Ausführung. Die Integration des LHCII in PG-Liposomen ist ein Standardverfahren und wurde auch in dieser Arbeit durchgeführt (vgl. 2.4.5).

Auch wenn solche Überlegungen sehr sinnvoll scheinen, sollte der Zeit-Nutzen-Aufwand berücksichtigt werden. Solange die QDs primär dazu herangezogen werden, um allgemeine Interaktionen und Energietransfermessungen zwischen LHCII und QDs zu untersuchen, und zwar mit dem Focus auf die Typ-II QDs, scheint der Einsatz von TCaEP weiterhin sinnvoll.

4.1.3 Auswahl des Puffers ist entscheidend für das Arbeiten mit QDs

Um die Hybridkomplexe aus LHCII und verschiedenen QDs eingehend untersuchen zu können, war es entscheidend, einen geeigneten Puffer für beide Komponenten zu finden. Da sich NaP-, Tris-HCl- und Natriumborat-Puffer in Untersuchungen am LHCII bereits bewährt hatten, wurden diese Puffer auch auf eine Eignung zur Untersuchung der Hybridkomplexe, insbesondere im Zusammenhang mit dem die QD-Emission stabilisierenden TCaEP (vgl. 4.1.1), geprüft. Die Zugabe eines hohen Überschusses von TCaEP zu einer gepufferten QD-Lösung bedeutet, dass dem System eine nicht unerhebliche Menge an Säure hinzugefügt wird, da TCaEP über drei Carboxylgruppen verfügt. Daher erscheint die Stabilisierung der QD-Fluoreszenz durch eine allgemeine Erhöhung Puffer-Konzentration nur logisch. Abhängig von der QD-Charge nahm bei Verwendung des NaP-Puffers die Fluoreszenz trotz der Erhöhung innerhalb eines Zeitraums von mehreren Tagen immer mal wieder ab (vgl. 3.1.2). Dies wurde jedoch auf chargenabhängige Qualitätsunterschiede zurückgeführt, wie sie z.B. in der äußeren ZnS-Schicht der QDs auftreten können (Breus, 2007). Die Mehrheit der QD-Proben fluoreszierte über mehrere Tage in NaP-Puffer stabil (vgl. 3.2.1). Aus diesem Grund wurden keine weiteren Versuche zur Optimierung des NaP-Puffers mit TCaEP durchgeführt.

Die Verwendung von Tris-HCl- oder Natriumborat-Puffer hat bei allen Untersuchungen gezeigt, dass es zunächst wie auch bei NaP-Puffer zu einer zeitabhängigen Stabilisierung der QD-Fluoreszenz kommt. Dass dennoch von einem Einsatz des Natriumborat-Puffers abgesehen wurde, liegt wie bereits erwähnt, daran, dass TCaEP und Natriumborat-Puffer in Kombination

zu unerwünschten (und unkontrollierbaren) Produkten mit Absorptionseigenschaften führen, über die die Einzelkomponenten nicht verfügen (vgl. Abb. 3.6). Ebenso wurde von einem weiteren Einsatz des Tris-HCl-Puffers abgesehen, da dieser zum einen nach längerer Inkubationszeit zu einer fast vollständigen Löschung der QD-Fluoreszenz führt und zum anderen, noch viel entscheidender, offensichtlich keine Interaktion zwischen LHCII und QD zulässt. Bei Verwendung des Tris-HCl-Puffers für Energietransfermessungen zwischen Typ-I QDs und LHCII (C3.2h) konnte weder eine Fluoreszenzlöschung des Donors noch eine sensibilisierte Akzeptorfluoreszenz beobachtet werden (vgl. Abb. 3.19). Wie später diskutiert, scheint sonst alleine die Anlagerung des LHCII an die QD-Oberfläche zu einer Löschung der QD-Emission zu führen (vgl. 4.2.1). Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass Tris-HCl bereits die Anlagerung des LHCII an die QDs verhindert. Der C3.2h kann in NaP-Puffer aufgrund seiner positiven Ladungen am N-Terminus und seines His₆-Tags am C-Terminus sowohl mit der DHLA wie auch mit ZnS-Oberfläche der QDs interagieren (vgl. 3.5.1). Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) als Hauptbestandteil vom Tris-HCl-Puffer hat einen pKs-Wert von ca. 8,2 bei RT. Bei einem pH um 8,5 liegen daher noch einige TRIS-Moleküle protoniert und somit positiv geladen vor. Durch eine schrittweise Belegung der negativ geladenen Liganden auf der QD-Oberfläche mit TRIS werden die Ladungen maskiert, was wiederum zu einer Aggregation der QDs führt. Ebenso wäre eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem positiv geladenen N-Terminus und der Liponsäure nicht mehr möglich. Dass der LHCII auch nicht über den His₆-Tag an die ZnS-Oberfläche binden konnte, spricht dafür, dass die QDs sich schon in einem aggregatähnlichen Zustand befanden. Es wäre ebenfalls möglich, dass TRIS auch die metallene QD-Oberfläche so dicht belegt, dass der LHCII keinen Zugang mehr findet. Diese Argumentation ist jedoch sicherlich gewagt, denn es gibt Paper, die im Zusammenhang mit QDs und FRET-Untersuchungen Tris-HCl-Puffer verwenden, ohne auf Probleme zu stoßen (z.B. Zhang, 2005). Zusammenfassend kann aber gesagt werden, dass die weitere Verwendung von Tris-HCl-Puffer im Zusammenhang mit den hier verwendeten QDs wenig sinnvoll ist.

NaP-Puffer hat sich in den Energietransferversuchen Versuchen mit QDs und LHCII mehr als bewährt, allerdings zeigte sich bei dem Versuch der Integration solcher Hybridkomplexe in die TiO₂-Schicht zum Bau einer kleinen Solarzelle, dass sich dieser Puffer nicht eignet, um die Komplexe an die Oberfläche zu adsorbieren. Während LHCII in Tris-HCl-Puffer zu einer hohen Belegungsdichte auf TiO₂ führte, konnte bei der Verwendung von NaP-Puffer der LHCII bzw. die LHCII-QD-Komplexe fast vollständig wieder herausgewaschen werden (vgl. 3.8.3). Orthophosphat interagiert mit TiO₂ bei einem pH-Wert um 9 sowohl über elektrostatische Wechselwirkungen als auch unter der Ausbildung eines zweizähligen Komplexes (TiO₂)PO₂ mit freien Titan-Ionen an der Oberfläche des TiO₂ (Gong, 2001). Durch die Oberflächenanlagerung des Phosphats werden elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der

Proteindomäne des LHCII und der Metalloxid-Oberfläche des TiO_2 (Chen, 2008) unterbunden und der LHCII wird durch die Waschschriffe mit Puffer wieder ausgespült. Da auch die QD-haltigen LHCII-Komplexe in NaP-Puffer nicht an das TiO_2 adsorbierten, sollte nach einem alternativen Puffer gesucht werden. Die Verwendung von Tris-HCl macht aufgrund zuvor genannter Gründe keinen Sinn. Da die Untersuchungen zur Wirksamkeit der Hybridkomplexe in Solarzellen im Wesentlichen nicht auf Absorptionsspektroskopie basieren, könnte Natriumborat-Puffer eine sinnvolle Alternative sein. Dieser Puffer wurde zur Untersuchung von Proteinen und QDs auch schon verwendet (Mattoussi, 2000). Eine einhergehende spektroskopische Untersuchung der LHCII-QD-Hybridkomplexe in Natriumborat-Puffer steht jedoch noch aus.

Die Wahl des Puffersystems für Untersuchungen von LHCII-OD-Hybridkomplexen hängt daher auch von der Untersuchungsmethode ab und muss unter Umständen immer wieder neu angepasst werden.

4.2 LHCII-QD Hybridkomplexe

4.2.1 Fluoreszenzlöschung in Typ-I QD/LHCII-Hybrid-Komplexen hat mehrere Ursachen

Die Kopplung der Typ-I QDs (CdSe/6xZnS/DHLA) an den LHCII hatte zum Ziel, die „Grünücke“ in der Absorption des LHCII aufzufüllen, indem die QDs ihre Anregungsenergie auf den LHCII übertragen. Die Ergebnisse der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen von Typ-I QD/LHCII-Hybridkomplexen zeigten eine deutliche Fluoreszenzlöschung der QDs, begleitet von einem Fluoreszenzzuwachs auf Seiten des LHCII. Beide Ereignisse nahmen mit der Erhöhung des LHCII/QD-Verhältnisses zu (vgl. 3.4.1). Diese Beobachtung wurde bei allen LHCII-Klonen, die über eine QD-Bindesequenz verfügten, gemacht (vgl. 3.4.3). Vergleicht man jedoch das Verhältnis der Flächen aus Fluoreszenzlöschung und sensibilisiertem Akzeptorzuwachs mit dem Verhältnis der Quantenausbeuten von LHCII und QD, so ergeben sich große Diskrepanzen. Wenn man davon ausgeht, dass es sich hier um einen FRET-Prozess handelt, so sollte sich das Verhältnis der Flächen mit dem Verhältnis der Quantenausbeuten decken, im Idealfall erhält man also eine Korrelation von 1 (in diesem Falle wäre der Wert beider Verhältnisse identisch). Im Durchschnitt liegt die Korrelation gemittelt für alle LHCII/QD-Verhältnisse jedoch nur bei ungefähr 0,4. Dies ist ein Hinweis darauf, dass nur ein Teil der Donor-Fluoreszenzlöschung tatsächlich auf einen Energietransfer zurückzuführen ist. Möglicherweise führt allein die Anlagerung des LHCII an die Nanopartikel zu einer Verringerung der QD-Fluoreszenzquantenausbeute. Somit wäre die Fluoreszenz der QD-Referenz, die zur Berechnung der Energietransfereffizienz herangezogen wird, zu hoch und führt zu einer Verzerrung der FRET-Betrachtung in den Hybridkomplexen. Eine Abschätzung

der Quantenausbeute der QDs nach Bindung des LHCII ist nicht möglich, da nicht ausgemacht werden kann, wie groß der mögliche Anteil des Energietransfers an der Fluoreszenzlöschung ist. Man kann dennoch sicher davon ausgehen, dass es sich hierbei um einen Effekt handelt, der auf eine Interaktion zwischen LHCII und den QDs zurückzuführen ist, denn die Bindung zwischen Typ-I QDs und verschiedenen LHCII-Varianten wurde bereits durch Zentrifugationsversuche nachgewiesen (Gundlach, 2010). Die Mischung von Typ-I QDs mit LHCII, der über keine QD-Affinitätssequenzen verfügt, führte nicht zu einer Veränderung der QD-Fluoreszenz (vgl. 3.4.3).

Auch der anhand des Försterradius ermittelte, theoretisch zu erwartende Energietransfer zwischen den Typ-I QDs und dem LHCII von ca. 9 % (vgl. 3.4.4) spricht für die Annahme, dass ein Teil der gelöschten Donorfluoreszenz nicht auf einen Energietransfer zurückzuführen ist. Die prozentuale Löschung der QD-Fluoreszenz in Hybridkomplexen aus CdSe/6xZnS/DHLA-QDs und LHCII lag bei mindestens 70 % und somit weit über den zu erwartenden 9 % (vgl. 3.4.3). Angenommen, der Energietransfer läuft in den Hybridkomplexen tatsächlich nur mit einer Effizienz von 9 % ab, dann ist es eigentlich auch nicht weiter verwunderlich, dass die sensibilisierte Akzeptorfluoreszenz nur so gering ausfällt. Dass aber eine QD-sensibilisierte LHCII-Emission in den Hybridkomplexen vorhanden ist, zeigen die Exzitationsspektren (Abb. 3.16). Die Differenz aus dem Exzitationsspektrum von LHCII mit QDs und reinem LHCII entspricht in ihrem Verlauf dem Absorptionsspektrum der QDs. Dies kann nur darauf zurückzuführen sein, dass der LHCII einen Teil der Anregungsenergie der QDs zur Fluoreszenz nutzen kann. Da die reine QD-Lösung bei den eingestellten Messparametern gar kein Signal von sich gibt, kann ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um eine reine Addition der QD- und der LHCII-Emission handelt. Eine solche sensibilisierte Akzeptorfluoreszenz konnte in den zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen nicht beobachtet werden. Hier wurde zwar ebenfalls eine kürzere Abklingzeit der QD-Emission in Hybrid-Komplexen mit LHCII im Vergleich zu reinen QD notiert, aber auf Seiten des Akzeptors konnte keine signifikante Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer ausgemacht werden (vgl. 3.4.1). Zunächst einmal gilt, dass falls die Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer der QDs auf einen Energietransfer zurückzuführen ist, sollte dies mit der Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer des Akzeptors einhergehen. So hätte sich die maximale LHCII-Emission im Vergleich zu reinem LHCII bei LHCII/QD-Hybridkomplexen in Richtung längerer Zeiten verschieben sollen (Schmitt, 2012). Dies wurde, wie gesagt, nicht beobachtet und bekräftigt, dass die Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer der QDs in den Hybridkomplexen, ebenso wie die beobachtete Fluoreszenzlöschung bei den stationären Fluoreszenzaufnahmen, auch auf andere Prozesse als auf Energietransfer zurückzuführen ist (Erker, 2010). Ein Energietransfer kann aber nur aufgrund des fehlenden Signals am LHCII in den zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen nicht ausgeschlossen werden. Es ist fraglich, ob unter diesen komplizierten Bedingungen überhaupt eine Veränderung am LHCII über diesen Weg zu detektieren wäre. Die zeitaufgelösten Messungen wurden nach einer

Anregung bei 560 nm, statt wie üblich bei 360 nm, durchgeführt. Dies resultierte schon in den stationären Messungen nur in eine kaum wahrnehmbare sensibilisierte Akzeptorfluoreszenz (vgl. 3.4.1).

Unabhängig davon, wie groß der Anteil eines FRETs an der Fluoreszenzlöschung der QDs ist, muss es noch eine weitere Ursache für diesen Effekt geben. Eine ähnliche Beobachtung im Zusammenhang mit einer Fluoreszenz-Löschung von Nanopartikeln durch Proteine wurde von Schmitt et al. (2012) unter anderem in Hybridkomplexen aus Typ-I CdSe/6xZnS-QDs und nativen trimeren Phycoerythrin (PE) gemacht. Hier wurde ebenfalls eine Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer der Nanopartikel beobachtet, die nicht mit einer Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer auf Seiten des Akzeptors einherging. Die Autoren diskutieren ihre Beobachtung mit der Formierung von Komplexen aus den QDs und PE, eine genaue Erklärung wird jedoch nicht geliefert. An dieser Stelle können die Mechanismen, die zu der Fluoreszenzlöschung der QDs in den Typ-I QD/LHCII-Hybridkomplexen führen, nicht genau aufgeklärt werden. Ein Aspekt soll an dieser Stelle jedoch noch einmal hervorgehoben werden. Bisher ist nicht bekannt, dass sich die Quantenausbeute des LHCII durch die Interaktion mit einem anderen Molekül einfach erhöht. Während fluoreszenzlöschende Ereignisse am LHCII durchaus unterschiedliche Ursachen haben können (z.B. Energietransfer, Aggregate, Zerfall), wurde eine Zunahme von LHCII-Fluoreszenz bislang nur auf Energietransfer zurückgeführt (Gundlach, 2009; Gundlach, 2010).

Der schwachen Absorption des LHCII im Bereich des grünen Lichts konnte über die Kopplung von CdSe/6xZnS/DHLA-QDs nicht entgegengewirkt werden. Es wäre dennoch durchaus erstrebenswert, LHCII-Hybridkomplexe mit Typ-I QDs zu testen, die über günstigere spektroskopische Eigenschaften verfügen, so dass der zu erwartende Energietransfer zwischen den QDs und dem LHCII größer ist. Dazu müsste die QD-Emission in Richtung Infrarotbereich verschoben sein. In diesem Bereich absorbiert der LHCII wesentlich besser und der Försterradius R_0 vergrößert sich erheblich mit der Verschiebung des Überlappungsintegrals von Donor und Akzeptor in Richtung Infrarotbereich (vgl. 2.7.3). So sollte der zu erwartende Energietransfer zwischen QD und LHCII weit über 10 % liegen. Da die Verschiebung des Emissionsmaximums von QDs in der Regel auch mit einer Vergrößerung der Nanopartikel einhergeht, sollte bei der Wahl der neuen Typ-I QDs darauf geachtet werden, dass der Abstand zum LHCII nicht zu groß und somit der Energietransfer wieder verringert wird. Außerdem darf das Emissionsmaximum auch nicht zu weit in den Infrarotbereich verschoben werden, da sonst ein Energie-Rücktransfer vom LHCII auf den QD immer wahrscheinlicher wird.

4.2.2 FRET-Betrachtungen zwischen Typ-I QDs und „alten“ LHCII-Varianten können nicht zur Analyse von Bindeaffinitäten herangezogen werden

Anhand eines Vergleichs der Fluoreszenzlöschung von Typ-I QDs in Hybridkomplexen mit verschiedenen LHCII-Varianten sollten Informationen über die QD-Affinität der Peptidsequenzen am Pigment-Protein-Komplex gewonnen werden. Die entsprechenden Messungen haben gezeigt, dass die Unterschiede in der Donorfluoreszenzlöschung durch die verschiedenen LHCII-Varianten C3.2h, D7f3, A7N und Z8N trotz verschiedener QD-Affinitätssequenzen nur geringfügig waren (vgl. 3.4.3). Gundlach (2010) hatte im Rahmen ihrer Doktorarbeit ebenfalls die Interaktion in diesen Hybridkomplexen untersucht. Die Auftrennung von an QDs gebundenem und ungebundenem LHCII erfolgte über Ultrazentrifugation. Auch hier wurden nur geringe Unterschiede in der Bindeaffinität festgestellt (sie lagen alle bei 55-72 %). Die ermittelte Reihenfolge in der Anziehung der LHCII-Varianten zu den QDs (C3.2h > Z8N > A7N > D7f3) deckt sich nicht mit der aus den in dieser Arbeit vorgestellten FRET-Analysen (Z8N > A7N > D7f3 > C3.2h). Die geringen Unterschiede zwischen den LHCII-Varianten sprechen eher für eine zufällige Reihenfolge. Bei beiden Untersuchungen wurden LHCII-Varianten verwendet, die jeweils über die positiven (nativen) Ladungen am N-Terminus verfügen. Da der LHCII auch über diese Ladungen mit den QDs interagiert (Erker, 2010; Werwie, 2012), kann nur schwer ausgemacht werden, inwiefern andere zusätzlich eingefügte Affinitäts-Sequenzen wie der His₆-Tag, die Z8- und die A7-Sequenz die Affinität zu den QDs steigern. Zu diesem Zeitpunkt lag außer dem D7f3 noch keine LHCII-Variante vor, die nur über eine Affinitätssequenz verfügte. Da sich die CdSe/6xZnS/DHLA-QDs für Untersuchungen des Energietransfers in Hybridkomplexen mit LHCII nur wenig eigneten, wurden alle weiteren Versuche zur Identifikation von QD-bindenden Proteinsequenzen mit den CdTe/3xCdSe/ZnS/DHLA-QDs durchgeführt.

4.2.3 Ligandengröße hat Einfluss auf FRET zwischen LHCII und Typ-II QDs

In den FRET-Untersuchungen an Hybridkomplexen aus LHCII und Typ-II QDs konnte eine deutliche Löschung der LHCII-Fluoreszenz und eine korrelierende stimulierte Akzeptorfluoreszenz beobachtet werden, unabhängig davon, ob die QD mit DHLA oder MPA belegt waren. Die FRET-Plausibilität war im Vergleich zu den Hybridkomplexen aus LHCII und Typ-I QDs hoch (vgl. 3.4.1 + 3.5.1). Während die LHCII-Fluoreszenz des C3.2h mit den DHLA-QDs zu maximal 65 % gelöscht wurde, konnte bei den MPA-QDs sogar eine Fluoreszenzlöschung von 75 % ermittelt werden. Der C3.2h kann sowohl über seinen C-terminalen His₆-Tag mit der ZnS-Hülle der QDs als auch über die positiven Ladungen am N-Terminus mit der Liponsäure bzw. Propionsäure auf der QD-Oberfläche interagieren (vgl. 3.5.1). Liegt ein Überschuss an QDs gegenüber den LHCII-Trimeren vor, so werden ab

einer bestimmten Konzentration zwei QDs pro LHCII-Trimer gebunden. Der LHCII ist dann in der Lage, auf beide QDs Energie zu übertragen. Eine solche Struktur aus zwei QDs an einem LHCII-Trimer ist sowohl für DHLA-QDs wie auch für MPA-QDs sehr wahrscheinlich. Die höhere Fluoreszenzlöschung des LHCII in Hybridkomplexen mit MPA-QDs ist daher auf die geringere Größe von MPA im Vergleich zu DHLA zurückzuführen (Abb. 4.1). Während der Abstand zwischen dem C-terminal (His₆-Tag) gebundenen QD und dem LHCII in beiden Systemen gleich ist, ist der Abstand zwischen dem N-terminal gebundenen QD und dem LHCII im MPA-System kleiner. Der LHCII kann hier daher mehr Energie auf den QD übertragen und die Löschung der Donorfluoreszenz fällt insgesamt höher aus als im DHLA-System.

Der steilere Verlauf der Fluoreszenzlöschungskurve bei DHLA-QDs im Vergleich zu MPA-QDs könnte ein Hinweis auf eine höhere Affinität des C3.2h zu DHLA-QDs als zu MPA-QDs sein (vgl. Abb. 3.22). Die DHLA als zweizähliger Ligand bindet gegenüber MPA als einzähligen Liganden etwas stabiler an die QD-Oberfläche und die DHLA-QDs sind daher unter Umständen dichter mit Liganden besetzt als die MPA-QDs (Algar, 2007). Ein höherer

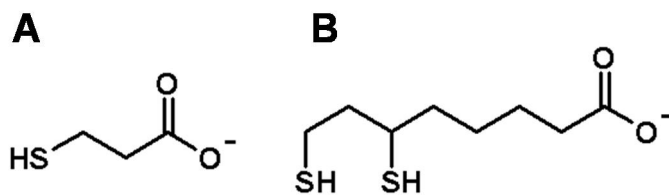


Abb. 4.1 Strukturformeln der Nanopartikel-Liganden Mercaptopropionsäure (MPA, A) und Dihydrolipoinsäure (DHLA, B). Die Liganden gewährleisten die Wasserlöslichkeit der QDs.

Anteil an negativer Ladung auf der QD-Oberfläche erhöht die Affinität der QDs zu den positiven Ladungen am N-Terminus des C3.2h. Die Dichte an Liganden auf der QD-Oberfläche hängt aber auch vom Alter der QDs ab (vgl. 3.5.1), daher kann die Affinität von DHLA- bzw. MPA-QDs zum LHCII von Charge zu Charge variieren. Trotz des effizienteren Energietransfers zwischen LHCII und MPA-QDs aufgrund geringerer Abstände wurde angesichts der höheren Bindungsstabilität des zweizähligen Liganden mit DHLA-QDs gearbeitet.

4.2.4 Cysteine im LHCII vermitteln Bindung an ZnS-Oberfläche von QDs

Bei vielen QD-Liganden wie z.B. Mercaptopropionsäure oder D-Penicilamin, handelt es sich um einzählige Liganden. Das heißt, diese Liganden binden nur über eine funktionale Gruppe an die QD-Oberfläche, in diesem Falle über eine Thiolgruppe. Offensichtlich reicht diese aus, um die Bindung an die QD-Oberfläche zu vermitteln. Es ist bekannt, dass im Vergleich zu zweizähligen Liganden diese Bindung weniger stabil ist (Algar, 2007). Unter der Berücksichtigung, dass der LHCII ein unverhältnismäßig größeres Molekül ist als die Liganden, erscheint zunächst das Einfügen eines oder zweier einzelner Cysteine in die Aminosäureabfolge des LHCII-Proteins wenig vielversprechend, um dadurch eine Bindung an den QD zu erzielen. Dennoch zeigte die LHCII-Cysteinmutante S3/160Ch gegenüber anderen Cysteinmutanten bzw.

der entsprechenden cysteinfreien Mutante einen deutlich effektiveren Energietransfer auf die QDs (vgl. Abb. 3.23). Jedes Monomer eines S3/160Ch-Trimers verfügt über zwei Cysteine an Position 3 und 106, so dass ein Trimer über 6 Cysteine verfügt, die theoretisch mit der QD-Oberfläche interagieren können. Dies gilt zwar auch für die Doppelcysteinmutante S106/160Ch, jedoch liegen die beiden Cysteine innerhalb des gefalteten Monomers einmal auf der stromalen und einmal auf der lumenalen Seite des LHCII (siehe dazu auch Abb. 4.4). Im Falle der S3/160Ch Mutante ist es so, dass sich beide Cysteine auf der stromalen Seite des LHCII befinden. Da alle Monomere eines Trimers parallel orientiert sind, liegen alle Cysteine auf einer Seite des LHCII und können sich an der Bindung eines QD beteiligen.

Der C3.2h entspricht in seiner Aminosäuresequenz nahezu dem des S3/160Ch. Er verfügt jedoch nicht über die zwei Cysteine in Position 3 und 160. Es wurde bereits gezeigt, dass der C3.2h in der Lage ist, zwei QDs pro Trimer zu binden, einmal über die positiven Ladungen am N-Terminus und einmal über den His₆-Tag am C-Terminus. Auch der S3/160Ch verfügt über diese beiden Bindesequenzen und kann somit zwei QDs pro Trimer binden. Der Unterschied in der Energietransfereffizienz zwischen den beiden LHCII-Varianten kann daher nur darauf zurückzuführen sein, dass entweder die Affinität der Cysteine zur ZnS-Oberfläche der QDs höher ist als die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem N-Terminus und der Liponsäure oder aber die hohe Flexibilität des N-Terminus (Docker, 2012) eine gleichzeitige Interaktion der positiven Ladungen und der Thiole mit dem QD erlaubt. Letzteres ist eher unwahrscheinlich, da das Cystein an Position 3 nahe den positiven Ladungen des N-Terminus liegt. Der Vergleich mit den Hybridkomplexen aus QDs und S3Ch zeigt, dass das eine Cystein an Position 3 keine Erhöhung des Energietransfers bewirkt. Auch in der LHCII-Variante S106/160Ch reicht das Cystein an der Position 160 nicht aus, um eine Verbesserung des Energietransfers im Vergleich zu C3.2h zu erzielen. Der optimierte Energietransfer bei S3/160Ch kann daher nur auf die Bindung der SH-Gruppen beider Cysteine an die ZnS-Hülle der QDs zurückzuführen sein. Dass es dabei zu einer geringeren Distanz zwischen LHCII und QD kommt, ergibt sich aus dem Vergleich der maximalen Fluoreszenzlöschung von C3.2h und S3/160Ch in einer gesättigten QD-Umgebung. Die Emission des C3.2h wird zu 65 % durch die QDs gelöscht, während die Fluoreszenzlöschung des S3/160Ch bei ca. 70 % liegt (vgl. 3.5.5). Der C3.2h kann N-Terminus nur über die positiven Ladungen an die negativen Ladungen der DHLA binden. So ist der Abstand zum stromal gebundenen QD größer als beim S3/160Ch und der Energietransfer ist in letzteren Hybridkomplexen effizienter.

Für eine genaue Bestimmung des Beitrags der beiden Cysteine zum Energietransfer zwischen dem S3/160Ch und den QDs müsste zunächst einmal der His₆-Tag entfernt werden. Da sich aber auch die positiven Ladungen am N-Terminus in der unmittelbaren Umgebung des Cysteins an Position 3 befinden, ist es schwierig, die über die beiden Cysteine vermittelte Bindung des LHCII an den QD eingehend zu untersuchen. Die LHCII-Variante

$\Delta N11/S34/S160C$ besitzt keinen His₆-Tag und der N-terminus ist um 11 As verkürzt. Die an Position 34 und 160 eingefügten Cysteine vermitteln jedoch keine Bindung zwischen dem LHCII und den QDs (vgl. 3.5.3). Vermutlich hat das Cystein an der Position 34 eine ungünstige Orientierung und kann dadurch nicht mit der QD- Oberfläche interagieren. Dockter (2009) konnte zeigen, dass die Wasser-Zugänglichkeit einer Sonde an Position 34 im LHCII-Trimer relativ hoch ist. Dies bedeutet, dass diese AS sich außerhalb der Detergenz-Mizelle in einer der wässrigen Umgebung zugänglichen Region befindet. Jedoch konnte er auch zeigen, dass die Position 34 von zwei Schleifenregionen umgeben und somit stabilisiert wird. Dadurch könnte das Cystein an Position 34 weniger flexibel als das Cystein an Position 3 sein und sich daher weniger gut an die QD-Oberfläche anlagern. Die Ergebnisse mit der LHCII-Variante $\Delta N11/S34/S160C$ bestätigten auch noch einmal die Annahme, dass ein einzelnes günstig gelegenes Cystein im LHCII nicht für eine Bindung an die QDs ausreicht.

Die Bedeutung der Cysteine an Position 3 und 160 im LHCII für eine Bindung an die QD-Oberfläche ist zugleich die Erklärung für eine an anderer Stelle notierte Beobachtung: Die LHCII sensibilisierte QD-Fluoreszenz in einem Hybridkomplex mit farbstoffmarkierten S3/160Ch fällt deutlich geringer aus als bei unmarkiertem S3/160Ch (vgl. Abb. 3.24). Zunächst einmal wurde davon ausgegangen, dass der Farbstoff an Cysteinen 3 und 160 eine Interaktion des N-Terminus mit der Liponsäure verhindert und somit nur noch der His₆-Tag für eine Bindung an die QDs zur Verfügung stand. Dagegen sprach aber, dass es keinen Hinweis auf einer Veränderung der Energietransfereffizienz zwischen markiertem und unmarkiertem S3Ch gab (Daten nicht gezeigt). Im Falle einer sterischen Behinderung der LHCII-QD Bindung am N-terminus durch den Farbstoff wäre eine Verschlechterung des Energietransfers bei dieser LHCII-Mutante aber zu erwarten, da das Cystein an der Position 3 den positiven Ladungen am N-Terminus sehr nahe ist. Der Unterschied in der Energietransfereffizienz bei markierten und unmarkierten S3/160Ch Hybridkomplexen scheint vielmehr darauf zurückführen zu sein, dass die Cysteine im unmarkierten S3/160Ch eine direkte Bindung an die ZnS-Hülle der QDs vermitteln und aufgrund des geringeren Abstandes zwischen den Chlorophyllen und den QDs zu einem effizienteren Energietransfer führen. Es ist nicht auszuschließen, dass der gebundene Farbstoff zusätzlich zu einer Vergrößerung des Abstands zwischen LHCII und QD führt. Ein direkter Vergleich mit den Daten aus Typ-II QDs und C3.2h (also dem entsprechenden Klon ohne Cysteine an Position 3 und 160) war nicht möglich, da die Versuche mit einer anderen QD-Charge durchgeführt wurden.

Die oben diskutierten Daten motivierten zur Entwicklung der LHCII-Variante mit vier Cysteinen (tC-C79S), die insbesondere im Vergleich zu anderen LHCII-Varianten eine hohe Affinität zu den QDs besitzt (vgl. 3.5.4). Bei dieser Mutante ist der N-terminus nicht verkürzt, so dass sie noch über alle nativen positiv geladenen AS in diesem Bereich verfügt. Da aber das Tetracystein-Motiv zwischen den AS 8 und 9 und somit unmittelbar neben den positiv

geladenen AS an Position 7 und 8 eingebaut wurde, kann die hohe Affinität und der optimierte Energietransfer zu den QDs (vgl. Abb. 3.25) nur auf die neu eingefügte Tetra-Cystein-Sequenz zurückgeführt werden. Eine gleichzeitige Bindung der positiv geladenen AS an die DHLA und der Cysteine an die ZnS-Oberfläche ist aufgrund der sehr geringen Abstände zwischen den AS unwahrscheinlich. Eine Interaktion des Lysins an Position 2 mit der DHLA ist zwar durchaus möglich, aber schon die Affinität des Z8- Δ N11 zu den QDs über zwei positive Ladungen am N-terminus ist gering (mehr dazu siehe 4.2.5), so dass man nicht von einem entscheidenden Beitrag des Lysin an Position 2 zur Interaktion mit den QDs ausgehen kann

Das Einfügen von mehreren Cysteinen in den LHCII ist also neben dem His₆-Tag eine weitere Alternative, um die Bindung zwischen LHCII und der ZnS-Hülle der QDs unter einer hohen Affinität zu vermitteln (siehe dazu auch 3.5.4). Die Herstellung einer LHCII-Variante mit zwei Cysteinen im Bereich des N-Terminus und zwei Cysteinen im Bereich der stromalen Schleife könnte zu einer effektiven Bindung des QD bei einem besonders kleinen Abstand zum QD führen, so dass das LHCII-Trimer noch mehr Anregungsenergie auf den QD transferiert.

4.2.5 Ermittelter Försterradius für LHCII und Typ-II QDs liefert plausible Daten

Der Försterradius von LHCII und Typ-II QDs konnte aufgrund der schwierigen Ermittlung des genauen Extinktionskoeffizienten der CdTe/3xCdSe/ZnS/DHLA-QDs nur näherungsweise berechnet werden. Um zu überprüfen, wie nahe dieser ermittelte Försterradius dem „realistischen“ Försterradius ist, sollen Abstände zwischen LHCII und QD, die sich aus dem ermittelten Försterradius und der Energietransfereffizienz ergeben, mit Abständen verglichen werden, die sich aus der mehr oder weniger bekannten Struktur von LHCII und QD ableiten lassen. Beide Herangehensweisen zur Bestimmung der Abstände kommen nicht ohne mindestens eine Annahme aus. Nachkommend soll gezeigt werden, dass ein Vergleich der Abstände zwischen verschiedenen LHCII-Varianten und den QDs, die sich aus beiden Ermittlungsstrategien ergeben, aufschlussreich ist.

Für die Berechnung eines Försterradius zwischen zwei Molekülen wird der Extinktionskoeffizient des Akzeptors benötigt. Theoretisch müsste der Extinktionskoeffizient der QDs immer wieder neu bestimmt werden, da dieser für jede QD-Charge anders ist. Hierfür muss die Konzentration der QDs genau bekannt sein. Sie kann jedoch nicht einfach über Absorption bestimmt werden, sondern muss beim Herstellungsprozess der QDs über die Menge an CdTe-Partikeln abgeschätzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten für eine QD-Charge gemacht, mit der auch ein Großteil der vorgestellten Messungen durchgeführt wurde (vgl. 3.5.1). Dabei wurde davon ausgegangen, dass die QD-Konzentration höchstens doppelt so hoch oder halb so hoch sein konnte wie über

die CdTe-Partikelbestimmung angenommen. Der ermittelte Försterradius R_0 lag dann bei $6,4 \pm 0,7$ nm. Mit dem Försterradius und dem maximalen Energietransfer des LHCII auf die QDs in einer QD-gesättigten Umgebung wurde der theoretische Abstand (r) mit Hilfe der folgenden Formel ermittelt:

$$ET_{Soll} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} .$$

Durch Umformen erhält man folgende Gleichung:

$$r = \sqrt[6]{\frac{R_0^6}{ET_{Soll} - R_0^6}} .$$

ET_{Soll} steht dabei für den zu erwartenden Energietransfer (vgl. 2.7.4) und wird hier durch den ermittelten maximalen Energietransfer (max. ET) ersetzt. Die Abstände zwischen dem LHCII und den QD wurden auf diesem Weg für mehrere LHCII-Varianten, die über nur eine Bindesequenz verfügten, bestimmt. Für die Berechnung wurde der Försterradius von 6,4 nm, also ohne die Fehlergrenzen-Abschätzung, zugrunde gelegt (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1 Abstandsdaten zwischen verschiedenen LHCII-Varianten und CdTe/CdSe/ZnS-QDs, ermittelt anhand des Försterradius bzw. struktureller Daten. Angegeben sind für verschiedene LHCII-Varianten der maximale Energietransfer (max. ET) auf CdTe/3xCdSe/ZnS/DHLA-QDs und der sich aus diesem und dem Försterradius R_0 ergebende Abstand (Abst. R_0). Außerdem werden Abstände zwischen dem terminalen Emitter im LHCII (Chl*a*1) zu den QD-Bindestellen (stromal oder lumenal gelegen), die sich aus der Literatur bzw. aus Kristallanalysen des LHCII ergeben, für jede Variante angegeben (Σ Abst.). Zusätzlich ist die Differenz aus beiden Herangehensweisen abgebildet (Diff.).

LHCII-Variante	max. ET [%]	Abst. R_0 [nm] ermittelt aus $R_0 +$ max. ET	Strukturell zu erwartende Abstände [nm]					Diff. Abst. strukt. zu R_0
			QD-Radius	DHLA	Chl <i>a</i> 1 zu Stroma	Chl <i>a</i> 1 zu Lumen	Σ Abst.	
D7f3	41	6,8	3,1	1	1,5	-	5,6	1,2
Z8- Δ N11	29	7,4	3,1	1	1,5	-	5,6	1,8
h- Δ N11	66	5,7	3,1	-	1,5	-	4,6	1,1
tC-C79S	51	6,4	3,1	-	1,5	-	4,6	1,8
Δ N11-h	51	6,4	3,1	-	-	3,1	6,2	0,2

Auch bei der Bestimmung des theoretischen Abstands zwischen LHCII und den QDs anhand von strukturellen Überlegungen müssen mehrere Variablen berücksichtigt und wie bei der Abstandsbestimmung über den Försterradius an einigen Stellen Näherungen angenommen werden. Zum einen kann der QD sowohl N-terminal als auch C-terminal an den LHCII binden und zum anderen kann der LHCII aufgrund seiner 14 gebundenen Chlorophylle nicht einfach wie z.B. ein QD als ein Molekül betrachtet werden, dessen Radius dann für Abstandsbestimmung herangezogen werden kann. Hier wurde daher näherungsweise der finale Emitter (Chl a 1, nach Standfuss, 2005) innerhalb des LHCII (vgl. 3.5.1) als Bezugspunkt für Abstandsermittlungen herangezogen (Abb. 4.2). Die Anregungsenergie wird innerhalb des LHCII sehr schnell auf dieses Chlorophyll übertragen (Novoderezhkin, 2005), so dass der Weitertransfer eines Großteils der Energie von diesem Chl auf den QD plausibel ist. Der Abstand innerhalb des LHCII wurde dann als der Abstand vom Chl a 1 zu einer möglichst nahe gelegenen AS am stromalen bzw. lumenalen Rand des LHCII festgelegt. Die Auswahl der AS erfolgte mit dem Programm Chimera (Pettersen, 2004), dabei wurde darauf geachtet, dass die ausgewählte AS möglichst randständig liegt und möglichst in der Verbindungslinie zum gebundenen QD liegt. Für die strukturelle Abstandsbestimmung wurde außerdem der Radius der QDs herangezogen. Der D7f3 und der Z8- Δ N11 binden aufgrund der positiven Ladungen an die negativen Ladungen der DHLA, daher wurde hier ein zusätzlicher Abstand von 1 nm durch die DHLA angenommen (Erker, 2010, Tabelle 4.1).

Um nun zu überprüfen, ob die ermittelten Abstandsdaten aus beiden Herangehensweisen plausibel sind bzw. ob eine sich als geeigneter erweist, wurden die Daten aus Försterradius und dem maximalen Energietransfer mit den strukturellen Daten verglichen und die Differenz ermittelt (Tabelle 4.1). Die größte Übereinstimmung zwischen den strukturellen und den R_0 -Daten ergab sich für die Mutante Δ N11-h. Anhand des Försterradius wurde ein Abstand zwischen LHCII und QD von 6,4 nm berechnet, der somit nur 0,2 nm größer war als der aus den strukturellen Daten ermittelte Abstand. Der Δ N11-h ist der einzige der verwendeten LHCII-Klone, bei dem der QD C-terminal gebunden wird. Da der Klon über den His $_6$ -Tag bindet, ist auch von einer direkten Interaktion mit der ZnS-Oberfläche des QDs auszugehen. Im Gegensatz zur N-terminalen Domäne konnte der C-Terminus des LHCII über Röntgenstrukturanalyse vollständig aufgelöst werden (Liu, 2004; Standfuss, 2005), so dass man hier von einer weit weniger flexiblen Struktur ausgehen kann. Daher ist zu erwarten, dass die angenommenen strukturellen Abstände den realen Abständen nahe kommen. Es ist jedoch durchaus möglich, dass der eingefügte His $_6$ -Tag am C-Terminus zu einer gewissen Flexibilität und somit auch zu einer Vergrößerung des Abstandes zwischen LHCII und QD führt. Dies könnte dann auch die Erklärung für die (geringe) Abweichung bei den über zwei verschiedene Herangehensweisen ermittelten Abständen sein.

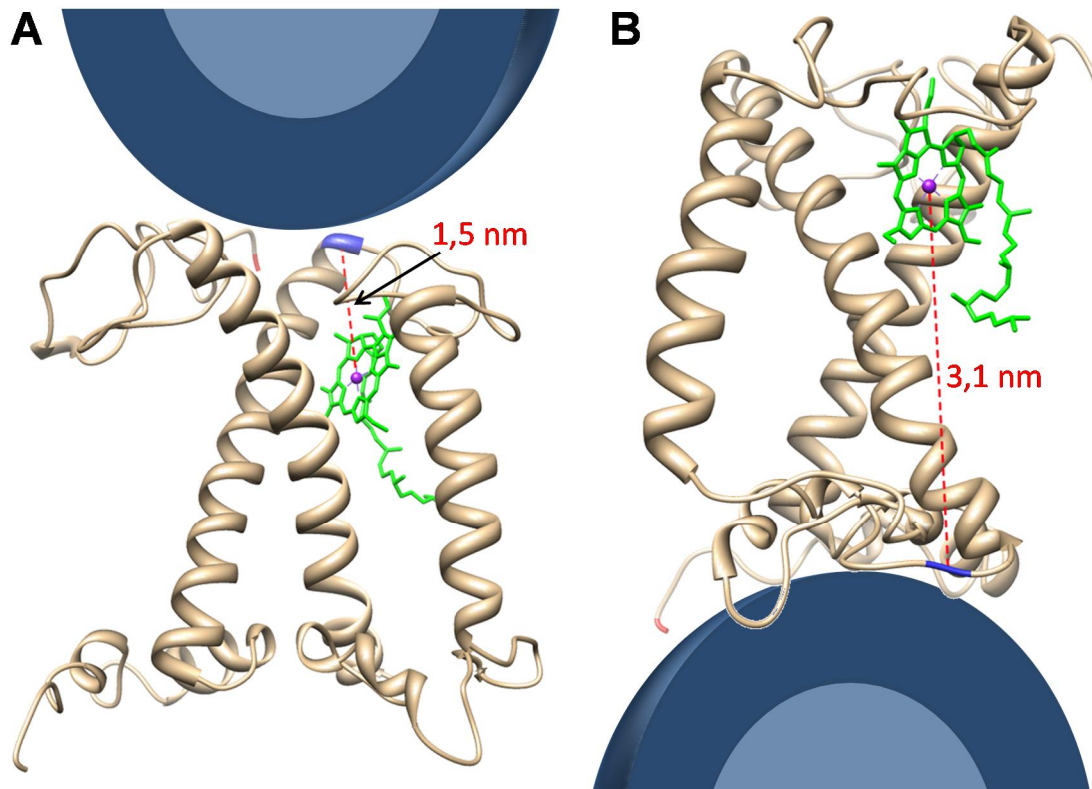


Abb. 4.2 Schematische Darstellung der Bindung von LHCII und QD. Die QD-Affinitätssequenzen befinden sich bei den verschiedenen LHCII-Varianten jeweils am Ende des Proteins (rot markiert). Zur Bestimmung der Abstände zwischen dem terminalen Emitter (Chl*a*1) und dem stromalen bzw. lumenalen Ende des LHCII wurden das Mg²⁺ (violett) des Chl*a*1 (grün) und das α C-Atom einer günstig liegenden Aminosäure herangezogen (rote, gestrichelte Linie). A: N-terminal gebundener QD, Abstand Chl*a*1 zu AS 170. B: C-terminal gebundener QD, Abstand Chl*a*1 zu AS 91. Zur Übersicht wurde nur das LHCII-Monomer abgebildet. Die Größenverhältnisse der Moleküle sind nicht maßstabsgetreu. Die an die QD-Oberfläche gebundene Liponsäure ist nicht berücksichtigt. Die LHCII-Abbildung wurde mit dem Programm Chimera erstellt (PDB-Eintrag 2BHW).

Wird der QD jedoch N-terminal gebunden, unabhängig ob der LHCII mit der DHLA oder der ZnS-Oberfläche interagiert, sind die Abweichungen zwischen den ermittelten Abständen deutlich größer (siehe Tabelle 4.1). Die Abstände aus den strukturellen Daten sind dabei zwischen 1,1 nm und 1,8 nm kürzer als die Abstände, die sich aus dem Försterradius ergeben. Dies ist mit Sicherheit auch darauf zurückzuführen, dass der N-terminus des LHCII eine hohe Flexibilität aufweist (Dockter, 2012). Aufgrund einer sterischen Abstoßung zwischen der negativen Nettoladung des LHCII und der negativen Ladung des DHLA ist die Einnahme einer gestreckten Formation des N-Terminus durchaus denkbar. Die Kristallstrukturen des LHCII erlauben nur eine Auflösung ab der 10. AS (Liu, 2004; Standfuss, 2005), so dass man davon ausgehen kann, dass der N-terminus bis zur AS 9 besonders flexibel ist (Dockter, 2012). In der Annahme eines durchschnittlichen Abstands von 0,15 nm pro AS entspricht dies bei 9 AS einer zusätzlichen Distanz von 1,35 nm. Dies kommt der Differenz bei den ermittelten Abständen zwischen 1,1 und 1,8 schon sehr nahe. Wenn man nun noch berücksichtigt, dass beim Z8- Δ N11 die nebeneinanderliegenden positiven Ladungen (RR, Tabelle 4.2) gegenüber den zwei positiv geladenen AS beim D7f3 (KK, Tabelle 4.2) um 7 AS in Richtung N-Terminus verschoben sind,

ist die Differenz von 1,2 nm (D7f3) bzw. 1,8 nm (Z8- Δ N11) zwischen den ermittelten Abständen durchaus plausibel. Der tC-C79S besitzt zwei Cystein-Pärchen, eines davon liegt im gleichen Bereich wie der His₆-Tag beim h- Δ N11, das andere liegt verschoben in Richtung N-Terminus (Tabelle 4.2). Da der maximale Energietransfer beim h- Δ N11 deutlich höher war als beim tC-C79S, wird vermutet, dass das randständigere Cystein-Pärchen maßgeblich für die Bindung dieses LHCII-Klon verantwortlich ist. Dies würde dann bedeuten, dass die anderen beiden Cysteine nicht an der Bindung beteiligt sind und zwei nebeneinander liegende Cysteine für die Bindung an die QD-Oberfläche ausreichend sind.

Tabelle 4.2 Aminosäuresequenz des N-Terminus verschiedener LHCII-Varianten.

LHCII-Variante	N-terminale Aminosäuresequenz																							
	AS-Position	5			10			15																
D7f3 (wt)		R	K	S	A	T	T	K	K	V	A	S	S	G	S	P	W	Y	G...					
Z8- Δ N11	L	R	R	S	S	E	A	H	N	S	I	V	G	G	S	R	G	S	A	W	Y	G...		
h- Δ N11										H	H	H	H	H	H	R	G	S	A	W	Y	G...		
tC-C79S	R	K	S	A	T	T	K	K	C	C	P	G	C	C	V	A	S	S	G	S	P	W	Y	G...

Grün gekennzeichnet: Vermutlich an Bindung beteiligte AS der LHCII-Varianten relativ zur AS 12 (rot) des wildtypischen LHCII (D7f3).

Für die Abstände, die über die Struktur ermittelt wurden, wurde die Dicke der Hülle aus DHLA mit 1 nm angenommen (Erker, 2010). Da die sechs AS des His₆-Tag beim h- Δ N11 unmittelbar an die (native) AS 11 angrenzen und beim D7f3 die nächsten positiv geladenen AS unweit davon an Position 7 und 8 liegen, muss der Abstand vom D7f3 zum QD hauptsächlich um den Abstand der DHLA größer sein als beim h- Δ N11. Die Abstände, die über den Försterradius ermittelt wurden, lagen beim D7f3 bei 6,8 nm und beim h- Δ N11 bei 5,7 nm. Dies entspricht einer Differenz von 1,1 nm und somit nahezu der angenommenen DHLA-Schichtdicke von 1 nm.

Die Abstandsdaten, die sich aus dem Försterradius für den Hybridkomplex aus LHCII und QD ergeben, decken sich im Prinzip nur in einem Fall mit den Abstandsdaten, die sich aus den strukturellen Annahmen decken, nämlich dann, wenn der QD luminal an den LHCII gebunden wird (Δ N11-h). Die größeren Abweichungen bei den anderen LHCII-Varianten scheinen aber vor allem darauf zurückzuführen zu sein, dass die Bindesequenz tragende N-terminale Domäne kristallographisch nicht aufgelöst ist und daher hier die Abstände nur grob geschätzt werden können. Da die Abweichungen alle in einem Bereich liegen, der sich ergibt, wenn man von einer sich streckenden Anordnung des N-Terminus ausgeht, scheint der ermittelte Försterradius dem realen Försterradius sehr nahe zu kommen, wenn nicht sogar identisch zu sein. Dies und die Korrelation zwischen den zu erwartenden mit den gemessenen Energietransfer-Effizienzen

geben ein rundes Gesamtbild in der Argumentation, dass der LHCII an die QDs koppelt und einen Teil seiner Anregungsenergie auf sie überträgt.

4.3 Triaden aus LHCII, Farbstoff und Typ-II Quantum Dots

4.3.1 Transferieren QDs Elektronen auf LHCII-gebundene Farbstoffe?

Um den Energietransfer zwischen LHCII und QDs zu optimieren, wurde die Strategie gewählt, Farbstoffe mit ganz bestimmten spektralen Eigenschaften kovalent an den LHCII zu knüpfen. So sollte zum einen die „Grünlücke“ des LHCII aufgefüllt werden und zum anderen sollten Farbstoffe als „Energie-Brücke“ dienen, um die Energietransfereffizienz zwischen LHCII und QD zu verbessern. Auf Letzteres zielte auch der Einsatz des Farbstoff Alexa₇₅₀-Mal ab. Bei diesen Versuchen wurde auf das QD-fluoreszenzstabilisierende Reduktionsmittel verzichtet, da der Farbstoff durch die Anwesenheit von TCaEP zerstört wird (vgl. Abb. 3.27). In der Triade aus LHCII, Alexa₇₅₀-Mal und QD wird die LHCII-Fluoreszenz mit 90 % deutlich stärker gelöscht als in den jeweiligen Dyaden mit ca. 60-70% (vgl. 3.6). Der LHCII kann also mehr seiner aufgenommenen Energie in der Triade als in einer Zweierkombination mit nur Farbstoff oder nur QD abgeben. Dabei fluoresziert auch der Farbstoff in der Triade weniger als in der Dyade mit LHCII. Als Erklärung hierfür sind drei Szenarien vorstellbar. Im ersten transferiert der LHCII zeitgleich seine Energie sowohl auf den Farbstoff wie auch auf den QD, ohne dass der Farbstoff und QD miteinander wechselwirken. In diesem Falle konkurriert der Farbstoff mit dem QD um die Anregungsenergie des LHCII und bekommt daher weniger Energie ab als in der Dyade mit dem LHCII. Der QD fluoresziert aufgrund des Fehlens von TCaEP kaum und kann daher auch nicht für weitere Untersuchungen herangezogen werden.

Im zweiten Szenario wird ein Teil der Energie, die vom LHCII auf den Farbstoff übertragen wurde, von dort weiter auf den QD transferiert. Die hier verwendete LHCII-Variante S106ChC verfügt über einen His₆-Tag am C-Terminus, so dass der QD überwiegend an die lumenale Seite des LHCII bindet, wo sich auch der Farbstoff befindet. QD und Farbstoff sind sich also räumlich nah. Man würde in diesem Falle erwarten, dass die QD-Fluoreszenz in der Triade gegenüber der Dyade zunimmt. Dies war jedoch nicht zu beobachten. Ein Rücktransfer der Energie vom QD auf den Farbstoff ist aufgrund der spektroskopischen Eigenschaften sehr unwahrscheinlich. Angesichts des fehlenden TCaEP ist die QD-Fluoreszenzquantenausbeute nicht nur sehr gering (ca. 1 %), sie ist auch sehr un stetig und konnte, wie bereits erklärt, nicht weiter untersucht werden. Der Grund für die Zerstörung der Farbstoffe durch das Reduktionsmittel TCaEP konnte nicht weiter aufgeklärt werden, da die genaue Struktur nicht bekannt ist.

Das dritte Szenario sieht vor, dass der QD auch daher so wenig fluoresziert, weil er ein oder mehrere Elektronen auf den Farbstoff überträgt. Ein solcher Prozess ist umso wahrscheinlicher,

je näher sich QD und Farbstoff kommen. In biologischen Systemen ist ein direkter Elektronentransfer zwischen zwei Komponenten auf einen Abstand von ca. 1 nm beschränkt (Gray, 1996). Da nur die Redoxpotentiale von den Valenz- und Leitungsbändern der QD-Bestandteile (Zhang, 2009), jedoch nicht das Redoxpotential der Farbstoffe bekannt ist, kann an dieser Stelle nicht über eine mögliche Potentialdifferenz zwischen angeregtem QD und dem Farbstoff diskutiert werden. Die niedrigere Fluoreszenz des Farbstoffs in der Triade im Vergleich zur Dyade mit LHCII könnte dann auch eine Folge des Elektronentransfers vom QD auf den Farbstoff sein. Wie beim Reduktionsmittel TCaEP wird der Farbstoff reduziert und verliert seine Fluoreszenzeigenschaften. Die Restfluoreszenz des Farbstoffs ist dann auf nicht zerstörten Farbstoff zurückzuführen, der seine Anregungsenergie vom LHCII erhält. In diesem Falle könnte die QD-bedingte Löschung der LHCII-Fluoreszenz ein Hinweis auf eine LHCII-sensibilisierte Ladungstrennung in QDs sein.

Die Triade aus LHCII, Alexa₇₅₀-Mal und QD wurde auch mit TCaEP vermessen. Während ein Großteil des Farbstoffs aufgrund des TCaEP in der Lösung zerstört ist und nur wenig fluoresziert, überträgt der LHCII seine Energie in der Triade auf den QD mit der gleichen Effektivität wie in der Dyade aus LHCII und QD (Abb. 4.3). Im Gegensatz zur Dyade fluoresziert aber der QD in der Triade trotz der Anwesenheit von TCaEP so gut wie nicht. Dieses Ergebnis bekräftigt das dritte Szenario und somit die Annahme, dass die QD-Emission durch die Anwesenheit des Farbstoffs, möglicherweise aufgrund eines Elektronentransfers, gelöscht wird.

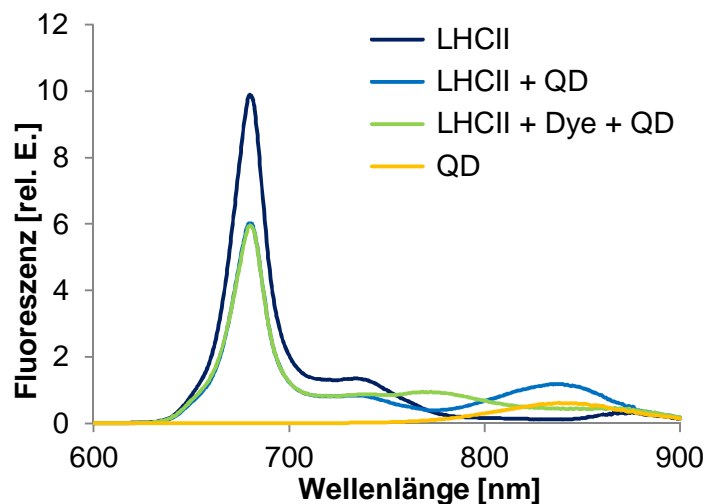


Abb. 4.3 Energietransfer in LHCII-Hybridkomplexen mit TCaEP. Emissionsspektren $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ von freiem LHCII (S106ChC) (dunkelblau) und von verschiedenen S106ChC-Hybridkomplexen. Hellblau: S106ChC + QD, grün: S106ChC + Farbstoff*, gelb: Triade aus S106ChC, Farbstoff und QD. Alle Proben wurden in *Standardpuffer* mit TCaEP angesetzt. LHCII-Trimer Konz: 15 nM, QD: 15 nM. (Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Heike Herold aufgenommen.)

*Farbstoff = Alexa₇₅₀-Mal = Dye

4.3.2 Rho₅₆₀-Mal und Typ-II QDs – Nachweis für einen Elektronentransfer durch die Nanopartikel?

Die Herstellung einer Triade aus LHCII, Rho₅₆₀-Mal (oder Bodipy₅₇₇-Mal) und Typ-II QDs sollte der schwachen Absorption des LHCII im Bereich des grünen Lichts entgegenwirken. Im

Gegensatz zum Alexa₇₅₀-Mal wird die Fluoreszenz des Rho₅₆₀-Mal nicht durch TCaEP gelöscht. Jedoch wurde auch in diesen Triaden eine Löschung der QD-Fluoreszenz vergleichbar zu den Versuchen mit Alexa₇₅₀-Mal beobachtet, die in farbstofffreien Hybridkomplexen nicht auftrat (vgl. Abb. 3.26). Die plausibelste Erklärung für diese Beobachtung scheint ein Elektronentransfer vom QD auf einen naheliegenden Farbstoff.

Für einen Elektronentransfer müssen Donor und Akzeptor in räumlicher Nähe zueinander liegen. Aus diesem Grund erschien es lohnend, die verschiedenen mit Rho₅₆₀-Mal markierten LHCII-Varianten auf eine positionsabhängige Löschung der QD-Emission zu analysieren. Dabei ergab sich folgende Reihenfolge für die QD-Fluoreszenzlöschung mit abnehmendem Einfluss von links nach rechts: S3Ch > S106Ch = V229Ch > S160Ch. Wie bereits mehrfach erläutert, können die QDs über die Liponsäure mit den positiven Ladungen im Bereich der N-Termini oder über Interaktion der ZnS-Oberfläche mit dem His₆-Tag an den LHCII binden. Im Rahmen der Markierungsversuche mit Rho₅₆₀-Mal verfügten alle verwendeten LHCII-Mutanten sowohl über einen His₆-Tag als auch über die positiven Ladungen am N-Terminus. Die Interpretation der Ergebnisse wird dadurch etwas erschwert, dass zwei der Klone (S106Ch und V229Ch) den His₆-Tag nicht wie üblich am C-Terminus sondern zu Beginn des N-Terminus tragen, also noch vor den positiven Ladungen. Die zuletzt erwähnten LHCII-Mutanten haben also beide Bindesequenzen am N-Terminus, also auf der stromalen Seite des LHCII, während der Farbstoff jeweils auf der lumenalen Seite des LHCII gebunden vorliegt (Position 106 und 229, Abb. 4.4). Der Abstand zwischen den Farbstoffen und dem N-terminal gebundenen QD sollte also wesentlich größer sein als 1 nm und ein Elektronentransfer über die Distanz des LHCII hinweg ist nahezu unmöglich. Die reine Betrachtung der Lage von Rho₅₆₀-Mal und QD erklärt auch nicht, warum der Farbstoff im S3Ch die QD-Fluoreszenz am stärksten löscht. Zwar ist hier eine hohe räumliche Nähe zwischen Farbstoff und N-terminal gebundenem QDs gegeben, aber der C-Terminus über den His₆-Tag gebundene QD sollte dann weiterhin eine normale Fluoreszenz zeigen, da er vom Farbstoff weit entfernt liegt (Abb. 4.4).

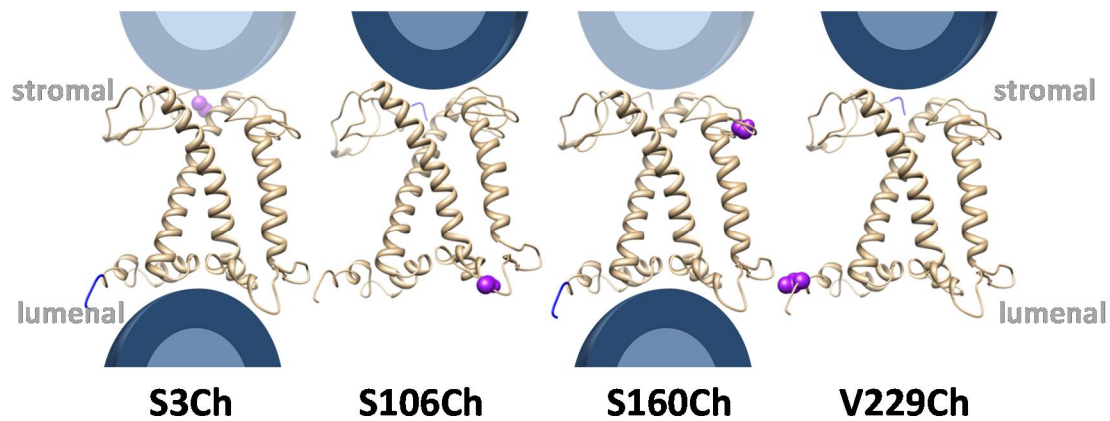


Abb. 4.4 Schematische Darstellung der Positionen von Farbstoff und QD bei verschiedenen LHCII-Varianten. Die Markierungsposition des Rho₅₆₀-Mal ist violett dargestellt, die ungefähre Lage des His₆-Tag im LHCII ist blau eingefärbt. Die Anlagerung des QD an den His₆-Tag ist durch einen blickdichten QD angedeutet, die Anlagerung eines QD an positive Ladungen im stromalen Bereich ist durch einen transparenten QD angedeutet. Beim S3Ch wurde die AS 10 als Markierungsposition für den Farbstoff gekennzeichnet, da die Struktur des LHCII nur bis AS 10 aufgelöst ist. Die LHCII-Abbildung wurde mit dem Programm Chimera erstellt (PDB-Eintrag 2BHW).

Die Anregungsspektren (und auch die nicht gezeigten Fluoreszenzspektren) zeigen jedoch eine fast vollständige Löschung der QD-Fluoreszenz. Auch die Ergebnisse mit dem S160Ch passen so nicht ins Bild. Das Cystein an der Position 160 in dieser LHCII-Mutante befindet sich auf der stromalen Seite des LHCII, QDs können hier sowohl N-terminal wie auch C-terminal binden. Dennoch wird die QD-Fluoreszenz in diesen Hybridkomplexen kaum gelöscht. Dies würde für einen doch recht großen Abstand zwischen Farbstoff und QD sprechen.

Da kein direkter Zusammenhang zwischen der QD-Löschung und der räumlichen Nähe von Farbstoff-Markierungsposition und QD-Affinitätssequenz am LHCII ausgemacht werden konnte, muss eine andere Erklärung für die Beobachtungen herangezogen werden. So könnte die Zugänglichkeit der Farbstoffe an den verschiedenen Positionen und eine direkte Interaktion zwischen dem Farbstoff und dem QD eine Rolle spielen. Die Absorptions- und Emissionsspektren einer Lösung mit 45 nM QDs und 45 nM Rho₅₆₀-Mal zeigen, dass ein Teil der QD-Emission in Anwesenheit des Farbstoffs gelöscht wird (Abb. 4.5). Dies bekräftigt die Annahme eines Elektronentransfers vom QD auf den Farbstoff und aufgrund der vergleichsweise niedrigen Konzentrationen der Komponenten kann man davon ausgehen, dass Farbstoff und QD also eine gewisse Affinität zu einander haben.

Wenn Farbstoff und QD unabhängig von der Lage der QD-Affinitätssequenz am LHCII miteinander interagieren, so könnte die Löschung der QD-Emission über eine allgemeine Zugänglichkeit des Farbstoffs erklärt werden. Während Rho₅₆₀-Mal an der Position 3 am LHCII demnach sehr frei zugänglich ist, scheint er an der Position 160 in die Mizelle hineinzuragen und somit kaum mit den QDs in Kontakt zu kommen. Dies ist gut möglich, da sich die AS 160 an der Grenzfläche zwischen dem hydrophoben und hydrophilen Teil der Detergenz-Mizelle befindet (Dockter, 2009; Volkov, 2009). Der Farbstoff ist seiner Struktur nach eher hydrophob und orientiert sich eher in das unpolare Innere der Detergenz-Mizelle. So können nur wenige

QDs ein Elektron auf den Farbstoff übertragen und die QD-Emission wird nur geringfügig gelöscht. Rho₅₆₀-Mal an den Positionen 106 und 229 führt zu einer stärkeren Löschung und wäre demnach zugänglicher als an Position 160. Da der QD sowohl beim S106Ch wie auch beim V229Ch auf der gegenüberliegenden Seite des Farbstoffs gebunden wird, kann dies nur bedeuten, dass der Farbstoff mit einem anderen QD interagiert. Zwar ist die Bindung von zwei LHCII-Trimeren an einen QD eher unwahrscheinlich (Werwie, 2012), möglicherweise reicht der Platz aber für eine Interaktion mit einem Rho₅₆₀-Mal-Molekül noch aus. Dass die stärkste Löschung der QD-Fluoreszenz auftritt, wenn der LHCII an Position 3 markiert wurde, könnte darauf zurückzuführen sein, dass naheliegende positive Ladungen zu einer verstärkten Anziehung der QDs führen. Außerdem ist diese Region des LHCII sehr flexibel, so dass eine Annäherung des gebundenen Farbstoffs an einen QD erleichtert wird.

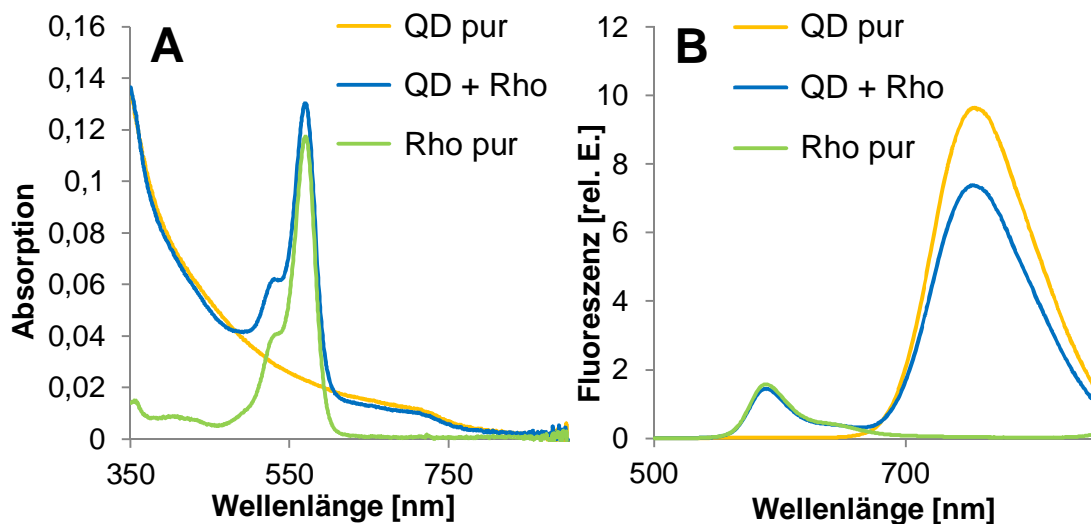


Abb. 4.5 Farbstoff löscht QD-Emission. Spektren einer Lösung mit Rho₅₆₀-Mal und QDs sowie der Einzelkomponenten in Standardpuffer mit 2 mM TCaEP. Die Konzentration der Komponenten betrug jeweils 45 nM. A: Absorptionsspektren. B: Emissionsspektren.

Zu diesem Zeitpunkt steht ein Beweis eines Elektronentransfers von den QDs auf die Farbstoffe trotz der vielen Hinweise noch aus, denn die Fluoreszenzlöschung der QDs könnte auch andere (dem Verfasser unbekannt) Gründe haben. Es könnte daher durchaus von Interesse sein, die Redoxpotentiale der Farbstoffe experimentell zu ermitteln. Wenn sich die Theorie eines Elektronentransfers bestätigt, könnte sich das Rho₅₆₀-Mal-QD-System für eine Untersuchung der Farbstoffzugänglichkeit am LHCII eignen. Darüber hinaus könnte die Farbstofffluoreszenz des Rho₅₆₀-Mal bzw. die Absorption des Alexa₇₅₀-Mal auch als Indikator für eine Elektronenabgabe der QDs fungieren. Die Farbstoffe sind möglicherweise für den Nachweis einer LHCII-sensibilisierten Ladungstrennung der QDs eine sinnvolle Alternative zu Methylviologen (siehe 4.4.1). Methylviologen wird nach der Reduktion schnell wieder durch Sauerstoff oxidiert, der daher zunächst aus den Lösungen entfernt werden muss. Die Reduktion der Farbstoffe dagegen scheint zu einer nicht reversiblen Strukturveränderung zu führen, sodass

sie nicht mehr fluoreszieren oder im Fall von Alexa₇₅₀-Mal auch nicht mehr absorbieren. Somit könnte auf eine Entfernung des Sauerstoffs in den Lösungen verzichtet werden.

4.4 LHCII sensibilisierte Ladungstrennung

4.4.1 Methylviologen eignet sich bedingt zum Nachweis der Ladungstrennung in QDs

Aufgrund der Farblosigkeit im oxidierten Zustand und seines breiten Absorptionsspektrums mit zwei Absorptionsmaxima bei 396 nm und 605 nm (vgl. Abb. 3.29) im reduzierten Zustand schien das Methylviologen (MV; MV^{2+} = oxidiertes Zustand, MV^+ = reduzierter Zustand) sich besonders gut für den Nachweis einer LHCII-sensibilisierten Ladungstrennung zu eignen. Da der LHCII eine sogenannte „Grünlücke“ aufweist, also im Bereich der grünen Wellenlängen verhältnismäßig wenig Licht absorbiert und auch die QDs hier kein Absorptionsmaxima besitzen, lässt sich die Veränderung der Absorption in einem LHCII-QD-MV-Gemisch durch die Entstehung von reduziertem MV^+ problemlos detektieren (vgl. Abb. 3.33). Zunächst wurde das System ohne vorherige Entfernung des Sauerstoffs geprüft. In einer gepufferten Lösung aus MV und dem Reduktionsmittel TCaEP, das später zur Stabilisierung der QDs benötigt wird, konnte in der Probe eine Reduktion des MV durch TCaEP gemessen werden, allerdings erst nach mehreren Minuten der Belichtung der Probe. Der Grund hierfür konnte nicht abschließend geklärt werden, eventuell spielt die entstehende Wärme durch die Belichtung eine Rolle. Da die Entstehung von MV^+ durch das TCaEP, auch nach Entfernung des Sauerstoffs, verhältnismäßig gering ausfällt und zudem reproduzierbar war, konnte dieser Effekt einfach über die Messung einer entsprechenden Referenz berücksichtigt werden (vgl. 3.7.3). Nach der Zugabe von QDs in das sauerstoffhaltende System konnte gezeigt werden, dass mehr MV^+ gebildet wurde, wenn die Probe bei 350 nm angeregt wurde, als wenn dies bei 670 nm geschah. Dies zeigt umso deutlicher, dass die Reduktion des MV auf eine Ladungstrennung des QDs zurückzuführen ist, denn die QDs nehmen bei UV nahen Wellenlängen deutlich mehr Lichtenergie auf, so dass auch mehr Ladungstrennung betrieben wird. Da die Ergebnisse durch die Anwesenheit von Sauerstoff in der Lösung nur schwer reproduzierbar waren, musste dieser aus den Proben entfernt werden.

Wenn die Lösungen zur Entfernung des Sauerstoffs entgast wurden, konnte schon nach wenigen Sekunden der Belichtung MV^+ nachgewiesen werden, aber das System liefert keine reproduzierbaren Daten (vgl. 3.7.2). Es ist kaum möglich zu verhindern, dass bei jedem Pipettierschritt wieder Sauerstoff in die entgasten Lösungen eintritt. Außerdem wird das System durch detergentzhaltige Lösungen, die nicht entgast werden können, verkompliziert. Ein Verzicht auf das Detergenz kommt ebenfalls nicht in Frage, da der LHCII als Membranprotein nicht ohne in Lösung gehalten werden kann. Dass die Probe mit LHCII und QDs im Vergleich

zu einer Probe mit nur QDs deutlich länger belichtet werden muss, um nachweislich MV^+ zu bilden (vgl. Abb. 3.32), weist daraufhin, dass der Sauerstoffanteil in der LHCII-haltigen Probe doch einen erheblichen Einfluss auf das System hat und es recht lange dauert, bis der Sauerstoff in der Umgebung durch Oxidation von MV^+ aufgebraucht ist. Erst dann kann das MV^+ mithilfe der Absorptionsspektroskopie nachgewiesen werden. Da also der Restsauerstoff in Lösungen, die nicht entgast werden können, auch bei kleinen Volumina einen erheblichen Einfluss hatte, musste ein Verfahren gefunden werden, bei dem der Sauerstoff vollständig aus allen Probenansätzen entfernt werden konnte.

Eine Entfernung des Sauerstoffs gelang dann über den Enzym-Mix aus Glucose-Oxidase und Katalase (vgl. 3.7.3). Nach einigen aufwendigen Messreihen zur Untersuchung des Beitrags von LHCII zur Ladungstrennung in QDs wurde festgestellt, dass der Enzym-Mix ebenfalls zu einer Reduktion des MV führte (vgl. Abb. 3.36). Diese Tatsache erschwert die Untersuchung des Systems und die Interpretation der Daten ungemein. Dennoch galt auch hier, dass die Menge des gebildeten MV^+ durch den Enzym-Mix reproduzierbar war. Dies lässt sich gut nachvollziehen beim Vergleich der Menge an MV^+ , das in einer Versuchsreihe mit dem Enzym-Mix und ohne TCaEP im Rahmen dieser Arbeit gemessen wurde (vgl. Abb. 3.35) im Vergleich zur gleichen Versuchsreihe aus der Bachelorarbeit von Anita Bohlender (vgl. Abb. 3.36).

In der Versuchsreihe mit dem Enzym-Mix wurde beobachtet, dass die Zugabe von LHCII in einer MV-Probe mit einer leicht erhöhten Bildung von MV^+ gegenüber der Referenz einhergeht. Dies geschah unabhängig davon, ob TCaEP in der Probe war oder nicht (Abb. 3.34 und Abb. 3.35). Die Menge an MV^+ ist zwar deutlich geringer als nach der Zugabe der QDs, dennoch war zunächst einmal nicht zu erwarten, dass der LHCII überhaupt in der Lage sein könnte, Elektronentransfer zu betreiben. Cardoso et al. (2011) beschreiben aber, dass sie den LHCII in eine synthetische Membran integriert und von dieser Struktur ausgehend eine lichtinduzierte Wasserstoffproduktion gemessen haben, die ohne LHCII nicht abgelaufen sei. Der Elektronentransfer soll demnach vom LHCII ausgegangen sein. Ebenso konnte nach Adsorption des LHCII an eine TiO_2 -Schicht einer elektrochemischen Solarzelle Strom erzeugt werden. Dies wurde mit einer Elektronenabgabe der Chlorophylle im LHCII an den Redoxmediator Methylviologen erklärt (Nagata, 2012). Die Daten dieser Arbeit wie auch die Literatur sprechen also dafür, dass der LHCII tatsächlich in der Lage ist, Elektronen an seine Umgebung abzugeben.

In Proben, die QDs enthielten, wurde stets eine stark erhöhte Reduktion von MV festgestellt. Es wird daher davon ausgegangen, dass dies auf einen Elektronentransfer der Nanopartikel zurückzuführen ist. Dies zeigt sich schon in den Probenansätzen ohne den Enzym-Mix, bei denen die Zugabe von QDs stets zu einem deutlichen Anstieg an MV^+ führte (vgl. Abb. 3.31 + Abb. 3.32). In den (durch Enzymbehandlung) sauerstofffreien QD-haltigen Proben lag die MV^+ -Konzentration nach 30 minütiger Belichtung zwischen ca. $10 \mu M$ (mit TCaEP) und ca. $45 \mu M$

(ohne TCaEP) und somit deutlich über der Konzentration der QDs ($0,5 \mu\text{M}$). Der flache Verlauf der MV^+ -Produktion im TCaEP haltigen System weist auf eine eintretende Stagnation des QD-abhängigen Elektronentransfers hin. Möglicherweise ist das EDTA ein geeigneter Elektronendonator für die QDs, so dass die entstehende Elektronenlücke im QD-Kern aufgefüllt wird und der QD mehrfach ein Elektron an das MV abgeben kann. Dies müsste aber noch einmal gezielt überprüft werden, denn in der Literatur ist dies nicht beschrieben. Sollte in einem gleichen Probenansatz bei Verzicht auf EDTA eine ähnliche MV-Reduktion gemessen werden, könnte dies damit erklärt werden, dass die QDs zu einer mehrfachen Ladungstrennung in der Lage sind, ohne dass die Elektronenlücke zuvor wieder aufgefüllt werden muss. Für CdSe-QDs wurde beschrieben, dass sie in der Lage sind, bis zu vier Elektronen-Loch-Paare nach Elektronentransfer auf MV zu generieren (Matylitsky, 2009). Da es sich bei den CdTe/ $3x$ CdSe/ZnS-QDs um Typ-II QDs handelt, bei denen das Elektronen-Loch-Paar sich zwischen dem Kern und der Schale befindet, wäre es durchaus vorstellbar, dass hier noch mehr Elektronen auf das MV übertragen werden können als z.B. bei Typ-I QDs aus CdSe. Unter Einbeziehung des durch die reine Puffer-Lösung gebildeten MV^+ und unter der Voraussetzung, dass das System sauerstofffrei war, wurden in dem TCaEP-freien System pro QD ca. 40 Elektronen auf das MV transferiert (vgl. Abb. 3.35).

Bei der Versuchsreihe mit Enzym-Mix und TCaEP fand die stärkste MV-Reduktion in Proben mit LHCII und QDs statt. Nach Abzug des durch den Puffer gebildeten MV^+ konnte in einer QD-haltigen Probe nach Zugabe von LHCII ein Plus von ca. 60 % an MV^+ bestimmt werden (vgl. Abb. 3.34). Dabei könnte es sich tatsächlich um eine LHCII sensibilisierte Ladungstrennung der QDs handeln. Die LHCII-Variante h- Δ N11 kann maximal 66 % ihrer Anregungsenergie auf den QD übertragen (vgl. Abb. 3.25), wobei in der Probe nicht unbedingt alle Trimere an einen QD gebunden vorliegen müssen. Da der LHCII bei 670 nm und unter den gewählten Konzentrationen ca. viermal so viel Licht absorbiert wie der QD (vgl. Abb. 3.33), wäre zu erwarten, dass in einem LHCII-QD System knapp das Dreifache an MV wie in einem System ausschließlich mit QDs umgesetzt wird. Zwar weicht der Faktor mit 1,6 recht deutlich davon ab, aber aufgrund anderer Einflüsse, die an dieser Stelle nicht berücksichtigt wurden wie z.B. dem Ausbleichen des LHCII nach längerer Belichtungszeit, ist es zumindest realistisch, dass der Faktor unterhalb von drei liegt. In der Versuchsreihe ohne TCaEP war auffällig, dass der LHCII den QDs nicht zu einer zusätzlichen Reduktion des MV verhelfen konnte (vgl. Abb. 3.35). Da die QDs ohne TCaEP zur Aggregation neigen, könnte es sein, dass der LHCII nicht mehr richtig an die QDs anlagern und somit auch keine Energie auf diese übertragen konnte. Dafür spricht auch, dass es nicht gelang, die Versuchsreihe ohne TCaEP noch einmal zu wiederholen, weil die QDs immer wieder aggregiert und ausgefallen sind (Daten nicht gezeigt). Es ist auch nicht auszuschließen, dass der QD sich am Rande der maximalen Elektronentransferrate befand, so dass die zusätzliche Energie durch den LHCII nicht zu

weiteren Ladungstrennungen führte. Ein Argument für diese Hypothese ist, dass sich im Gegensatz zum System mit TCaEP eine Sättigung der MV-Reduktion andeutete (vgl. Abb. 3.35). Besonders auffällig im Vergleich der Systeme mit und ohne TCaEP ist außerdem, dass schon der Grundumsatz von MV ohne TCaEP deutlich höher ist als mit TCaEP (vgl. Abb. 3.34 + Abb. 3.35). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Enzyme, die in der Lösung ebenfalls zu einer Reduktion des MV führen, durch das TCaEP teilweise zerstört werden. Dadurch wird weniger MV^+ durch die Enzyme gebildet und möglicherweise nicht aller Sauerstoff aus den Proben entfernt. Ein Teil des durch die QDs gebildeten MV^+ wird durch den noch vorhandenen Rest-Sauerstoff wieder oxidiert, so dass der messbare MV-Umsatz in einem TCaEP haltigen Probenansatz niedriger ist als in einem TCaEP-freien Ansatz.

Es ist möglich, dass in den TCaEP haltigen System aus LHCII, Nanopartikeln und MV eine LHCII-sensibilisierte Ladungstrennung der QDs gezeigt wurde. Zur genauen Aufklärung dieser Frage könnte die Aufnahme von zeitaufgelösten Absorptionsmessungen sinnvoll sein, wie sie auch schon in organischem Lösungsmittel gemacht wurden (Dworak, 2011). Hier wäre es nicht notwendig, den Sauerstoff aus den Proben zu entfernen, so dass auf den (reduzierend wirkenden) Enzym-Mix verzichtet werden könnte. Dies würde die Untersuchung einer LHCII sensibilisierten Ladungstrennung in QDs und auch den Nachweis einer direkten Ladungstrennung durch den LHCII wesentlich erleichtern.

4.4.2 LHCII-Adsorption auf TiO_2 -Platten optimiert

Eine Möglichkeit der technischen Anwendung von LHCII-QD-Hybridkomplexen ist die Integration in elektrochemische Solarzellen nach dem Prinzip der DSSCs. Dazu müssen die Komplexe zunächst in eine Schicht aus Halbleitermaterialien wie z.B. TiO_2 integriert werden. (vgl. 1.3.1). Damit LHCII-Trimere in die inneren Schichten des TiO_2 diffundieren und dort binden können, müssen die Poren des Halbleiters nach dem Sinterprozess eine ausreichende Größe haben. Die Versuche haben gezeigt, dass die Ausgangspartikel des TiO_2 größer als 50 nm sein sollten (vgl. 3.8.1). Die Schwierigkeit bei Verwendung größerer Partikel (70-100 nm) lag hauptsächlich in der mangelnden Stabilität der TiO_2 -Schicht nach dem Sinterprozess. Nach mehreren wenig erfolgreichen Versuchen zur Optimierung der TiO_2 -Stabilität wurde stattdessen auf die kommerziell erhältlichen Platten der Firma Solaronix (Schweiz) zurückgegriffen, da diese eine ausreichende Stabilität hatten und eine gute LHCII-Belegungsichte von bis zu $0,6 \text{ nmol/cm}^2$ erzielt wurde (vgl. 3.8.2). Die Schichtdicke der Platten beträgt $60 \mu\text{m}$ und ist somit vergleichbar mit den TiO_2 -Platten von Lion (2005) mit einer geschätzten Dicke von $50 \mu\text{m}$. Dort wurde zwar eine LHCII-Belegungsichte von $0,9 \text{ nm/cm}^2$ erreicht, jedoch erst nach mehreren Wochen wiederholten Auftragens einer LHCII-Lösung.

Die Versuche zur Erhöhung der LHCII-Belegungsichte auf TiO_2 erfolgten in Tris-HCl-Puffer (vgl. 3.8.1). Dieser Puffer konnte im Zusammenhang mit QDs nicht verwendet werden,

da er die Interaktion zwischen LHCII und QD verhindert (vgl. 3.4.2). Deshalb wurde auf NaP-Puffer zurückgegriffen, der sich bei den FRET-Untersuchungen der LHCII-QD-Hybridkomplexe bereits bewährt hatte. In diesem Puffer gelang jedoch nahezu keine Belegung des TiO₂ mit LHCII bzw. LHCII und QDs (vgl. Abb. 3.46).

Die Adsorption von Proteinen an die Oberfläche des Halbleiters erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen (Chen, 2008). Über elektrostatische Wechselwirkungen kann Phosphat ebenfalls mit TiO₂ interagieren und sogar einen Komplex mit freien Titan-Ionen an der Oberfläche des TiO₂ bilden (Gong, 2001). Dadurch scheint die Interaktion des LHCII mit dem TiO₂ verhindert zu werden (siehe 4.1.3 und 4.4.3). Wurde Tris-HCl-Puffer verwendet, wurden die Protein-Interaktionen nicht gestört und der LHCII blieb trotz mehrerer Waschschrte an der TiO₂-Oberfläche haften. Da dieser Puffer sich aber nicht für die Anwendung bei LHCII-QD-Hybridkomplexen eignet (vgl. 3.4.2), muss ein anderer Puffer zur Adsorption von LHCII-QD-Hybridkomplexen an TiO₂-Oberflächen verwendet werden. In diesem Falle könnte Natriumborat-Puffer ein geeigneter Kandidat sein, da dieser wie der NaP-Puffer zu einer stabilen QD-Emission führte. Zwar scheinen TCaEP und Natriumborat-Puffer einem absorbierenden Produkt zu reagieren (vgl. Abb. 3.6), dies muss bei der Belegung der Komplexe auf TiO₂ aber nicht unbedingt stören. Es sollte jedoch zunächst geprüft werden, ob in diesem Puffer ein Energietransfer vom LHCII auf die QDs stattfindet.

4.4.3 LHCII-TDI_{Gs}- bzw. LHCII-QD-Konstrukte geeignet für Solarzellen?

Um letztlich effiziente Solarzellen zu erhalten, sollte der LHCII als Lichtsammler mit einem zur Ladungstrennung befähigten Energieakzeptor gekoppelt und in geeignete Halbleiterschichten integriert werden. Mögliche Kandidaten hierfür sind verschiedene QDs oder auch der Farbstoff TDI_{Gs}. Während der Energietransfer zwischen LHCII und den CdTe/3xCdSe/ZnS-QDs bereits gezeigt werden konnte, steht dies für die Kombination von LHCII mit TDI_{Gs} noch aus. Zunächst einmal ist ein Energietransfer zwischen LHCII-Trimeren und nicht funktionalisiertem Farbstoff in einer Lösung aufgrund zu großer Abstände eher unwahrscheinlich. Dennoch könnte es sich bei der niedrigeren LHCII-Emission in der Lösung aus LHCII und TDI_{Gs} im Vergleich zu einer gleichkonzentrierten reinen LHCII-Lösung um Energietransfer handeln (vgl. 3.8.2). Da TDI_{Gs} ein hydrophober Farbstoff ist (vgl. 2.2.6), scheint er sich zu Teilen in den Detergenz-Mizellen gelöst zu haben. Dort kamen sich der LHCII und die Farbstoffmoleküle räumlich sehr nahe, so dass ein Energietransfer stattfinden konnte. Da TDI_{Gs} eine sehr niedrige Fluoreszenzquantenausbeute besitzt, konnten keine weiteren Untersuchungen zum Energietransfer über Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt werden.

Die Funktionalität von LHCII-TDI_{Gs}-Komplexen sollte dann fortführend mit Hilfe der Solarzell-Module von Solaronix untersucht werden. Da der Farbstoff nur in organischem Lösungsmittel gelöst werden konnte, mussten Farbstoff und LHCII zunächst getrennt

voneinander auf die TiO_2 -Oberfläche aufgebracht werden, mit dem Erfolg, dass sich der Farbstoff überwiegend in den unteren Schichten des TiO_2 -Schicht einlagerte und nach einer anschließenden Inkubation der LHCII überwiegend an die höheren Schichten adsorbierte (vgl. 3.8.2). Wurde nur LHCII in Tris-HCl-Puffer auf die TiO_2 -Platten gegeben, war ebenfalls die Tendenz zu erkennen, dass der LHCII sich eher in den unteren als in den oberen Schichten des TiO_2 einlagerte, auch wenn der Effekt bei TDI_{GS} deutlicher ausfiel. Dies spricht dafür, dass die Porengröße des TiO_2 nicht einheitlich ist und sich aufgrund dessen mehr Moleküle unten anlagern können. Dabei muss es nicht zwangsläufig so sein, dass die TiO_2 -Poren in den unteren Schichten größer sind. Wenn diese ausreichend groß sind, dass die Moleküle hineindiffundieren können, bietet eine dichtere Oberflächenstruktur sogar mehr Anlagerungsmöglichkeiten für die verschiedenen Moleküle. Da es sich bei den Platten um kommerziell hergestellte Platten handelt und die Firma Solaronix keine Angaben zur Homogenität der Schichtung macht, kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Es ist auch nicht ganz klar, warum besonders der Farbstoff sich fast ausschließlich in den unteren Schichten des TiO_2 anlagert. Dies hängt mit Sicherheit auch damit zusammen, dass das Lösungsmittel sehr flüchtig ist und zunächst in den oberen Schichten verdampft. Der Farbstoff zieht sich mit dem Lösungsmittel in die unteren Schichten zurück und hat dort mehr Zeit, mit dem TiO_2 zu reagieren. Die Glutarsäure des Farbstoff reagiert dabei mit dem TiO_2 und tritt mit diesem über die zwei Carboxylgruppen in starke hydrophile Wechselwirkungen (Edvinsson, 2009). Aufgrund der Schichtproblematik scheint es sinnvoll, in Zukunft den LHCII und den Farbstoff zeitgleich auf die TiO_2 - Oberfläche aufzutragen. Ein Überschuss an Farbstoff zum LHCII ist wünschenswert und um dies zu erreichen, sollte eine aufkonzentrierte LHCII-Lösung mit einer relativ hohen Detergenz-Konzentration hergestellt und anschließend zur Lösung von (getrocknetem) TDI_{GS} verwendet werden. So sollte möglichst viel Farbstoff in der LHCII-Lösung aufgenommen und anschließend auf die TiO_2 -Oberfläche aufgetragen werden. Möglicherweise wird jedoch durch die hohe Detergenz-Konzentration eine Verknüpfung zwischen Farbstoff und dem TiO_2 verhindert.

Die Aufnahme von Wirkungsspektren mit den Platten aus TDI_{GS} und LHCII gaben trotz der ungünstigen Verteilung der beteiligten Komponenten Anlass zu Optimismus. Es konnten zwei Signale bei 450 nm und 670 nm ausgemacht werden, die den Absorptionsmaxima des LHCII entsprechen und daher auf eine LHCII sensibilisierte Ladungstrennung durch den Farbstoff zurückzuführen sein könnte (vgl. Abb. 3.45). Dieser Effekt sollte durch eine optimierte Belegung des TiO_2 mit LHCII und Farbstoff deutlich verbessert werden können. Zwar konnten aufgrund der Interaktion des NaP-Puffers mit dem TiO_2 keine Wirkungsspektren von LHCII-QD-Hybridkomplexen aufgenommen werden (vgl. 3.8.3), aber das Wirkungsspektrum einer TiO_2 -Platte mit nur QDs zeigte hohe EQE-Werte (vgl. Abb. 3.47). Da der Energietransfer zwischen dem LHCII und den QDs sehr effizient ist (vgl. Werwie, 2012), sind diese Hybrid-

Konstrukte besonders vielversprechend. Hier sollte daher ein geeignetes Puffersystem zur Adsorption der Komplexe an TiO₂-Oberflächen gefunden werden (vgl. 4.1.3)

4.5 LHCII kann in detergentfreien Lösungen durch wasserlösliche Proteine stabilisiert werden - kein Einbau des LHCII in Ringprotein Hcp1

Eine Integration des LHCII in das Ringprotein Hcp1 hätte unter Umständen zu einer erhöhten Temperaturstabilität des Pigment-Protein-Komplexes führen können. Die Versuche zur Integration liefern jedoch keinen Hinweis darauf, dass LHCII in den Hohlraum des Hcp1 gedrängt werden konnte. Zwar konnte durch Hcp1 eine Stabilisierung des LHCII in einer detergentfreien Umgebung beobachtet werden, jedoch war dieser Effekt noch größer, wenn statt Hcp1 BSA verwendet wurde (vgl. 3.9). Vermutlich reicht der Durchmesser des Hohlraums im Hcp1 von 4 nm nicht für eine Insertion der LHCII-Trimere aus (Ballister, 2008). Dies war durchaus zu erwarten, da der (native) LHCII aus einer 3,5 nm dicken Lipiddoppelschicht stromal bis zu 1,3 nm und lumenal bis zu 0,8 nm herausragt (Standfuss, 2005). Man kann also davon ausgehen, dass eine Ringstruktur mit einem Durchmesser von mehr als 5 nm vonnöten wäre, um den LHCII einschließen zu können. Die Stabilisierung des LHCII durch Hcp1 und BSA ist daher eher auf eine Anlagerung der wasserlöslichen Proteine um die LHCII-Trimere und somit einem Schutz vor Zerfall nach Entzug des Detergenzes zurückzuführen. Dieser Effekt wurde auch nach der Zugabe von BSA beobachtet und führte hier sogar zu noch stabileren Komplexen. Wurden die Proben 1 zu 100 verdünnt und Fluoreszenzspektren aufgenommen, hat sich gezeigt, dass tendenziell umso weniger LHCII zerfiel, je größer der Überschuss an wasserlöslichem Protein war. Die höchste Fluoreszenz trat dabei in LHCII-Proben mit BSA auf (Daten nicht gezeigt). Es ist mehrfach beschrieben, dass BSA hydrophobe Wechselwirkungen mit anderen Strukturen eingeht (Larsericdotter, 2005; Song, 2012). So scheint es sich auch beim LHCII an die hydrophoben Bereiche anzulagern und eine stabilisierende Wirkung auszuüben. Die CD-Spektren der detergentfreien LHCII-Lösungen mit BSA bzw. Hcp1 weisen Veränderungen auf, die auf Trimer-Aggregate zurückzuführen sind. So besitzen sie einen vergleichsweise kleinen Peak bei 680 nm, wie es auch für LHCII-Trimere im aggregierten Zustand beschrieben wird (Ruban, 1997). Da dieser Effekt aber umso niedriger ist, je höher die Konzentration des wasserlöslichen Proteins ist und die CD-Spektren auch noch die typischen Trimer-Signale bei 472, 492, 650, 666 und 680 nm zeigen (Hobe, 1994), kann man davon ausgehen, dass ein Großteil der Trimere für weitere Versuche (detergentfrei) zur Verfügung steht. Die Stabilisierung der LHCII-Trimere durch BSA könnte in Zukunft ein hilfreicherer Ansatz sein, wenn man detergent- oder liposomenfrei arbeiten möchte. So könnte die Interaktion des LHCII mit künstlichen Membransystemen wie z.B. Blockcopolymeren (Cardoso, 2011) untersucht werden. Hier liegt eine Schwierigkeit in der Entfernung des

Detergenzes, ohne gleichzeitig auch das künstliche Polymer zu entziehen. Nach der Zugabe von BSA zu einer LHCII-Lösung könnte dagegen das Detergenz zunächst mit Hilfe von Biobeads entzogen und erst anschließend das künstliche Polymer hinzugegeben werden. Das BSA könnte dann über Proteaseverdau, beispielsweise Trypsin (Bruce, 1999), entfernt werden. Befindet sich der LHCII in einer schützenden Hülle, ist ein Großteil des Proteins vor Trypsinverdau geschützt und bleibt in seiner Struktur erhalten (Paulsen, 1993). Auf diesem Weg könnte die Integration des LHCII in künstliche Membranen nachgewiesen werden.

4.6 LHCII und Lanthanoide

4.6.1 Lanthanoid-Maleimide können Anregungsenergie auf LHCII übertragen

Wegen ihrer besonders langen Lumineszenzlebensdauer sind Lanthanoide für die Markierung des LHCII von besonderem Interesse. Sie fluoreszieren noch zu einem Zeitpunkt nach der Anregung, in dem alle anderen (pflanzlichen) angeregten Moleküle bereits wieder in den Grundzustand gelangt sind und daher kein Fluoreszenzlicht mehr abgeben. Eine Markierung des LHCII mit Lanthanoiden *in vivo* könnte daher eine vielversprechende Methode sein, um vielschichtige Informationen über den LHCII in der Pflanze zu bekommen (vgl. 1.4.2.3). Zunächst einmal sollte daher geschaut werden, ob es gelingt, rekombinanten LHCII gezielt mit Lanthanoiden zu markieren und einen Energietransfer zwischen den Komponenten nachzuweisen. Ein erster Schritt hierzu war die Markierung des LHCII mit Lanthanoiden, die an Maleimidgruppen gekoppelt waren und somit kovalent an den LHCII gebunden werden konnten. Diese Markierungsmethode hat gezeigt, dass der LHCII die Anregungsenergie der Lanthanoide für sich nutzen kann, selbst bei einer Wartezeit nach der Anregung von 100 μsec (vgl. Abb. 3.51). Bei der Markierung des LHCII mit Tb-Mal führte erst eine Mehrfachmarkierung zu einem messbaren Energietransfer. Mit dem Eu-Mal konnte schon eine Zunahme der LHCII-Emission nach Markierung der Einfachcystein-Mutante S3Ch beobachtet werden, bei der Markierung des 4xCh schien das Verhältnis zwischen LHCII-Emission und Lanthanoid Emission vergleichbar zum S3Ch zu sein. Dies ist aber auch nicht unbedingt verwunderlich, da die Proben über Ultrazentrifugation aufgereinigt wurden. So sollte kein freier Farbstoff vorliegen und jeder gebundene Maleimid-Farbstoff überträgt einen Teil seiner Anregungsenergie auf den LHCII. Je mehr gebundene Farbstoffstoffe am LHCII vorliegen, desto höher ist die Farbstoffemission, aber desto mehr Energie kann auch auf den LHCII transferiert werden.

Es fällt auf, dass auch die reine LHCII-Probe 100 μsec nach Anregung noch ein Fluoreszenzsignal abgibt (Abb. 3.51). Zwar können die Chlorophylle bei 331 nm ebenfalls angeregt werden, der LHCII hat jedoch eine Fluoreszenzlebensdauer von nur ca. 4 ns (Palacios, 2002). Eine Ruhezeit von 100 μsec nach Anregung der Probe sollte also mehr als genügend Zeit

für den LHCII sein, um aus seinem angeregten Zustand wieder in den Grundzustand zu gelangen. Hier zeigt sich die begrenzte Nutzbarkeit des verwendeten Messgeräts Tecan InfiniteM1000 für die Aufnahme von zeitverzögerten Messungen. Das Gerät wird mit einer Xenon-Lampe betrieben, deren Licht im Gegensatz zu einem Laser nach Ausschaltung noch nachleuchtet. Dieses vorhandene Restlicht reicht scheinbar aus, um den LHCII noch nach 100 μ sec anzuregen. Da aber die LHCII-Emission in der reinen LHCII-Probe ausnahmslos niedriger war als in mit Lanthanoiden markierten LHCII-Proben, konnte von einem Energietransfer zwischen den Lanthanoiden und dem LHCII ausgegangen werden.

4.6.2 LBT am LHCII führt zu spezifischer Markierung mit Europium, begleitet von einem effektiven Energietransfer

Für eine Markierung des LHCII *in vivo* kommen die Maleimid-funktionalisierten Lanthanoide nicht in Frage, da in der Pflanze viele Proteine vorkommen, die Cysteine enthalten. Außerdem müsste der Farbstoff erst mal in die Pflanzenzellen gebracht werden. Daher ist eine Markierung des LHCII über Lanthanoid-Affinitätssequenzen vielversprechender. Diese wäre nicht nur spezifisch, sondern hätte auch den Vorteil, dass Terbium und Europium, die Zellmembran passieren können (vgl. Einleitung).

Die eingefügte LBT-Sequenz am LHCII hat eine besonders hohe Affinität zu Terbium (Martin, 2005). Die vorliegenden Versuche haben gezeigt, dass auch Europium mit der für Terbium entwickelten Affinitätssequenz interagiert (vgl. 3.10.2). Aufgrund dessen, dass in den Proben mit Eu^{3+} und Tb-C79Sh auch nach der Aufreinigung über eine Ultrazentrifugation eine Europium-Emission detektiert wurde, die mit LHCII ohne die LBT-Sequenz nicht zu beobachten war (vgl. Abb. 3.52), wird von einer spezifischen Bindung des Europium an den Tb-C79Sh ausgegangen. Auch für andere Tb-Affinitätssequenzen wurde eine hohe Affinität für Eu^{3+} angegeben (Reynolds, 2008). Der Zuwachs an LHCII-Emission in Eu^{3+} markiertem LHCII im Vergleich zu reinem LHCII ist deutlich. Ein Akzeptorzuwachs konnte auch schon nach Markierung des 4xCh mit Eu-Mal ausgemacht werden, jedoch war er weit weniger ausgeprägt. Der 4xCh verfügt über 4 Cysteine, an die theoretisch je ein Farbstoff binden kann, und Markierungen mit dem Farbstoff Rho₅₆₀-Mal am 4xCh haben gezeigt, dass der LHCII zu ca. 75 % markiert wurde (Werwie, 2009). Wenn Ähnliches für Eu-Mal gilt und alle LBT-Stellen der Tb-C79Sh-Trimere mit Eu^{3+} besetzt wurden, verfügt der markierte 4xCh vermutlich über dreimal so viel gebundene Eu-Komplexe wie der Tb-C79Sh. Sollten nicht alle LBT-Sequenzen besetzt worden sein, dann ist das Verhältnis sogar noch größer. Der Energietransfer in beiden Systemen hängt von mehreren Faktoren wie z.B. den Abständen zwischen Donor und Akzeptor, Quantenausbeute und die Fluoreszenzlebensdauer des Donors etc. ab. Zwar kann an dieser Stelle kaum etwas über diese Punkte gesagt werden, aber ein Vergleich des Zuwachses an LHCII-Emission in beiden Systemen ist möglich. Dieser ist besonders gut am Tb-C79Sh

auszumachen, obwohl nur eine Bindestelle pro LHCII-Monomer vorliegt. Die Markierungsreaktion zwischen dem Eu^{3+} und dem Tb-C79Sh wurde bei mikromolaren Konzentrationen durchgeführt. Dies zusammen spricht dafür, dass das Eu^{3+} eine recht hohe Affinität zur Tb-Sequenz hat und seine Energie effektiv auf den LHCII überträgt. Da es nicht auszuschließen ist, dass die Affinität der Tb-Sequenz zu Terbium noch höher ist und außerdem die Terbium-Lumineszenz nicht mit der LHCII-Fluoreszenz überlappt, könnte die Markierung des TB-C79Sh mit Terbium noch vielversprechender sein.

Die LBT-Sequenzen scheinen sich nach bisherigen Ergebnissen prinzipiell für eine Markierung des LHCII mit Lanthanoiden *in vivo* zu eignen. Um dies umsetzen zu können, müssten transgene Pflanzen hergestellt werden (Flachmann, 1996), die über die Information für einen LHCII mit LBT-Sequenzen verfügen. Da transgene Pflanzen aber nach wie vor auch über die Information für den nativen LHCII verfügen, wäre es von Vorteil, die Expression dieser Gene möglichst zu unterdrücken (Padidam, 2003).

5. Zusammenfassung

Der *light harvesting complex II* (LHCII) ist ein pflanzliches Membranprotein, das in seiner trimeren Form über 40 Chlorophylle bindet. In der Pflanze kann er besonders effizient Licht sammeln und die Anregungsenergie anschließend fast verlustfrei über andere chlorophyllbindende Proteine an die Reaktionszentren weiterleiten. Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften war es ein Ziel dieser Arbeit, rekombinanten LHCII mit synthetischen Komponenten zu kombinieren, die zur Ladungstrennung befähigt sind. Zu diesem Zweck wurden unter anderem Halbleiternanokristalle (*Quantum Dots*, QDs) ausgewählt, die je nach Zusammensetzung sowohl als Energieakzeptoren als auch als Energiedonoren in Frage kamen. Durch Optimierung des Puffers gelang es, die Fluoreszenzquantenausbeute der QDs in wässriger Lösung zu erhöhen und zu stabilisieren, so dass die Grundvoraussetzungen für die spektroskopische Untersuchung verschiedener LHCII-QD-Hybridkomplexe erfüllt waren.

Unter Verwendung bereits etablierter Affinitätssequenzen zur Bindung des LHCII an die QDs konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten Typ-I QDs aus CdSe und ZnS sich kaum als Energie-Donoren für den LHCII eignen. Ein Hauptgrund lag im vergleichsweise kleinen Försterradius R_0 von 4,1 nm. Im Gegensatz dazu wurde ein R_0 von 6,4 nm für den LHCII als Donor und Typ-II QDs aus CdTe, CdSe und ZnS als Akzeptor errechnet, wodurch in diesem System eine höhere Effizienz des Energietransfers zu erwarten war. Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen von Hybridkomplexen aus LHCII und Typ-II QDs ergaben eine hohe Plausibilität für einen Fluoreszenz Resonanz Energietransfer (FRET) vom Lichtsammler auf die QDs. Weitere QD-Affinitätssequenzen für den LHCII wurden identifiziert und deren Bindekonstanten ermittelt. Versuche mit dem Elektronenakzeptor Methylviologen lieferten gute Hinweise auf eine LHCII-sensibilisierte Ladungstrennung der Typ-II QDs, auch wenn dies noch anhand alternativer Messmethoden wie z.B. durch transiente Absorptionsspektroskopie bestätigt werden muss.

Ein weiteres Ziel war die Verwendung von LHCII als Lichtsammler in *dye-sensitized solar cells* (DSSC). Geeignete dotierte TiO₂-Platten wurden ermittelt, das Verfahren zur Belegung der Platten optimiert und daher mit wenig Aufwand eine hohe LHCII-Belegungsdichte erzielt. Erste Messungen von Aktionsspektren mit LHCII und einem zur Ladungstrennung fähigen Rylensfarbstoff zeigen eine, wenn auch geringe, LHCII sensibilisierte Ladungstrennung.

Die Verwendung von *Lanthanide-Binding-Tags* (LBTs) ist ein potentielles Verfahren zur *in vivo*-Markierung von Proteinen mit Lanthanoiden wie Europium und Terbium. Diese Metalle besitzen eine überdurchschnittlich lange Lumineszenzlebensdauer, so dass sie leicht von anderen fluoreszierenden Molekülen unterschieden werden können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es, eine LBT in rekombinanten LHCII einzubauen und einen Lumineszenz Resonanz Energietransfer (LRET) vom Europium auf den LHCII nachzuweisen.

Summary

The light harvesting complex II (LHCII) is a membrane protein and consists of more than 40 chlorophylls in its trimeric version. In plants it performs efficient light harvesting and transfers the excitation energy nearly quantitatively via other pigment-binding proteins to the reaction center. Due to these LHCII properties it was of interest to combine recombinant LHCII with synthetic compounds that are capable of charge separation. To this end semiconductor nanocrystals, so-called Quantum dots (QDs), were chosen as energy acceptors. Depending on their composition, QDs can also serve as energy donors. By optimizing the buffer system, the QDs fluorescence quantum yield in aqueous solution has been enhanced and stabilized, fulfilling the prerequisites for spectroscopic investigations of different LHCII-QD hybrid complexes.

By using established affinity tags to bind LHCII to QDs it was shown that type-I nanocrystals from CdSe and ZnS were no efficient energy donors for LHCII, presumably due to the small Förster radius (R_0) of 4.1 nm. By contrast, a larger R_0 of 6.4 nm was estimated for hybrid complexes of LHCII as donors and type-II QDs (CdTe, CdSe, ZnS), thus a higher efficiency of energy transfer was expected. Complexes of LHCII and type-II QDs exhibited fluorescence properties that were indicative of Förster-type energy transfer from LHCII to QD. Additional QD-affinity tags have been established for the LHCII and their binding constants were estimated. Experiments with the electron acceptor methyl viologen indicated an LHCII sensitized charge separation in QDs. This preliminary result still needs to be confirmed, for example transient absorption spectroscopy.

Another objective was to integrate LHCII-hybrid complexes into dye-sensitized solar cells (DSSCs). Suitably doped TiO_2 plates were loaded by an optimized procedure, enhancing the LHCII density on the plates. Preliminary recordings of action spectra with LHCII and a rylene dye as a sensitizer showed a small but significant LHCII-sensitized charge separation.

The use of lanthanide binding tags (LBTs) is a possibility for *in vivo* labeling of proteins with lanthanides like terbium and europium. These metals have an extraordinary long luminescence lifetime making them easily distinguishable from other fluorescent molecules. In this work an LBT was introduced into recombinant LHCII and luminescence resonance energy transfer was shown to take place from europium to LHCII.

6. Literatur

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.

Ballister, E. R., Lai, A. H., Zuckermann, R. N., Cheng, Y., Mougous, J. D. (2008) In vitro self-assembly from a simple protein of tailorable nanotubes building block. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105, 3733–3738.

Ballottari, M., Girardon, J., Dall'Osto, L., Bassi, R. (2012) Evolution and functional properties of Photosystem II light harvesting complexes in eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, 1817, 143–157.

Bals, T., Dünschede, B., Funke, S., Schünemann, D. (2010) Interplay between the cpSRP pathway components, the substrate LHCP and the translocase Alb3: An in vivo and in vitro study. *FEBS Lett.*, 584, 4138–4144.

Barber, J. (2007) Biological solar energy. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 365, 1007–1023.

Barros, T., Kühlbrandt, W. (2009) Crystallisation, structure and function of plant light-harvesting complex II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1787, 753–772.

Bartusel, B. (2011) Bindung von biologischem Lichtsammler (LHCII) an "Quantum Dots": gelelektrophoretische Untersuchungen. *Bachelorarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Beddard, G. S., Porter, G. (1976) Concentration quenching in chlorophyll. *Nature*, 260, 366–376.

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-Lichtsammlerkomplex LHCIIb in Liposomen, an Affinitätsmaterialien und Nanokristallen. *Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Bohlender, A. (2012) Herstellung einer LHCII Mutante zur Optimierung der Bindung an Quantum Dots und Nachweis einer LHCII-sensibilisierten Ladungstrennung in Quantum Dots. *Bachelorarbeit*, 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.

- Bruce, J. E., Anderson, G. A., Wen, J., Harkewicz, R., Smith, R. D. (1999) High mass-measurement accuracy and 100% sequence coverage of enzymatically digested bovine serum albumin from an ESI-FTICR mass spectrum. *Anal. Chem.*, *71*, 2595–2599.
- 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.
- Cardoso, M. B., Smolensky, D., Heller, W. T., Hong, K. L., O'Neill, H. (2011) Supramolecular assembly of biohybrid photoconversion systems. *Energy Environ. Sci.*, *4*, 181–188.
- 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., Nie, S. M. (1998) Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, *281*, 2016–2018.
- Chen, C. S., Yao, J., Durst, R. A. (2006) Liposome encapsulation of fluorescent nanoparticles: Quantum dots and silica nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, *8*, 1033–1038.
- Chen, H. B., Su, X. D., 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.
- Cline, D. J., Redding, S. E., Brohawn, S. G., Psathas, J. N., Schneider, J. P., Thorpe, C. (2004) New water-soluble phosphines as reductants of peptide and protein disulfide bonds: Reactivity and membrane permeability. *Biochemistry*, *43*, 15195–15203.
- Dabbousi, D. O., Rodrigues-Viejo, J., Mikulec, F. V., Heine, J. R., Mattoussi, H., Ober, R., Jensen, K. F., Bawendi, M. G. (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.
- Dang, Y. Q., Li, H. W., Wu, Y. Q. (2012) Construction of a Supramolecular Forster Resonance Energy Transfer System and Its Application Based on the Interaction between Cy3-Labeled Melittin and Phosphocholine Encapsulated Quantum Dots. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, *4*, 1267–1272.
- 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. (2012) Structural analysis of the major light-harvesting complex II by electron paramagnetic resonance (EPR): comparison between monomers and trimers. *Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- 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., Müller, A. H., Dietz, C., Volkov, A., Polyhach, Y., Jeschke, G., Paulsen, H. (2012) Rigid Core and Flexible Terminus Structure of Solubilized Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Complex (LHCII) Measured by EPR. *J. Biol. Chem.*, 287, 2915–2925.
- Dworak, L., Matylitsky, V. V., Breus, V. V., Braun, M., Basche, T., Wachtveitl, J. (2011) Ultrafast Charge Separation at the CdSe/CdS Core/Shell Quantum Dot/Methylviologen Interface: Implications for Nanocrystal Solar Cells. *J. Phys. Chem. C*, 115, 3949–3955.
- 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., 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.
- Englander, S. W., Calhoun, D. B., Englander, J. J. (1987) Biochemistry without Oxygen. *Anal. Biochem.*, 161, 300–306.
- Erker, W., Boggasch, S., Xie, R. G., Grundmann, G., Paulsen, H., Basche, T. (2010) Assemblies of semiconductor quantum dots and light-harvesting-complex II. *J. Lumin.*, 130, 1624–1627.
- Falk, S., Sinning, I. (2010) cpSRP43 Is a Novel Chaperone Specific for Light-harvesting Chlorophyll *a,b*-binding Proteins. *J. Biol. Chem.*, 285, 21655–21661.
- Fehr, N. (2010) Untersuchung der Bindungseigenschaften zwischen "Light Harvesting Complex II" und Halbleiternanokristallen (Quantum Dots). *Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Fischer, S. A., Am Crotty, Kilina, S. V., Ivanov, S. A., Tretiak, S. (2012) Passivating ligand and solvent contributions to the electronic properties of semiconductor nanocrystals. *Nanoscale*, 4, 904–914.
- Flachmann, R., Kühlbrandt, W. (1996) Crystallization and identification of an assembly defect of recombinant antenna complexes produced in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 14966–14971.

- Frank, H., Cogdell, R. (1996) Carotenoids in photosynthesis. *J. Photochem. Photobiol.*, *63*, 257–264.
- 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.
- Gong, W. Q. (2001) A real time in situ ATR-FTIR spectroscopic study of linear phosphate adsorption on titania surfaces. *Int. J. Miner. Process.*, *63*, 147–165.
- Grätzel, M. (2001) Photoelectrochemical cells. *Nature*, *414*, 338–344.
- Grätzel, M. (2007) Photovoltaic and photoelectrochemical conversion of solar energy. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *365*, 993–1005.
- Gray, H., Winkler, J. (1996) Electron transfer in proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, *65*, 537–561.
- Green, M. A., Emery, K., Hishikawa, Y., Warta, W., Dunlop, E. D. (2012) Solar cell efficiency tables (version 40). *Progress In Photovoltaics*, *20*, 606–614.
- Gundlach, K. (2010) Pflanzlicher Lichtsammler (LHCII) in Hybridkomplexen mit organischen Farbstoffen und anorganischen Halbleiter-Nanokristallen (Quantum dots). *Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- 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, Bioenerg.*, *1787*, 1499–1504.
- Ham, M.-H., Choi, J. H., Boghossian, A. A., Jeng, E. S., Graff, R. A., Heller, D. A., Chang, A. C., Mattis, A., Bayburt, T. H., Grinkova, Y. V., Zeiger, A. S., van Vliet, K. J., Hobbie, E. K., Sligar, S. G., Wraight, C. A., Strano, M. S. (2010) Photoelectrochemical complexes for solar energy conversion that chemically and autonomously regenerate. *Nat. Chem.*, *2*, 929–936.
- 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., Piechulla, B. (Akad Verl, 2008) Pflanzenbiochemie. 4th ed., Heidelberg, Spektrum.
- Herold, H. (2011) Optimierung des Energietransfers zwischen biologischen Lichtsammlern und Halbleiternanokristallen. *Bachelorarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- 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.
- 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.

- Huschenbett, C. (2001) Zugänglichkeit einzelner Domänen des Lichtsammelkomplexes LHCII: ein Vergleich zwischen Monomeren und Trimeren. *Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Jansson, S. (1994) The light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1184, 1–19.
- Kim, S., Bawendi, M. G. (2003) Oligomeric Ligands for luminescent and stable nanocrystal quantum dots. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 14652–14653.
- Kim, S.-S., Na, S.-I., Nah, Y.-C. (2011) TiO₂ nanotubes decorated with ZnO rod-like nanostructures for efficient dye-sensitized solar cells. *Electrochimica Acta*, 58, 503–509.
- 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.
- Kühlbrandt, W. (1994) Structure and function of the plant light-harvesting complex, LHC-II. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 4, 519–528.
- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lakowicz, J. R. (2006) Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed., New York, *Springer*.
- Larsericdotter, H., Oscarsson, S., Buijs, J. (2005) Structure, stability, and orientation of BSA adsorbed to silica. *J. Colloid Interface Sci.*, 289, 26–35.
- Lauterbach, R., Liu, J., Knoll, W., Paulsen, H. (2010) Energy Transfer between Surface-immobilized Light-Harvesting Chlorophyll a/b Complex (LHCH) Studied by Surface Plasmon Field-Enhanced Fluorescence Spectroscopy (SPFS). *Langmuir*, 26, 17315–17321.
- 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, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gul, L., An, X., Chang, W. (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Angstrom resolution. *Nature*, 428, 287–292.
- Martin, L. L., Sculimbrene, B. R., Nitz, M., Imperiali, B. (2005) Rapid combinatorial screening of peptide libraries for the selection of lanthanide-binding tags (LBTs). *QSAR Comb. Sci.*, 24, 1149–1157.
- Mattoussi, 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.

- Matytilsky, 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.
- McConnell, I., Li, G., Brudvig, G. W. (2010) Energy Conversion in Natural and Artificial Photosynthesis. *Chem. Biol.*, *17*, 434–447.
- Medintz, I. L., Clapp, A. R., Mattoussi, 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.
- Mershin, A., Matsumoto, K., Kaiser, L., Yu, D., Vaughn, M., Nazeeruddin, M. K., Bruce, B. D., Graetzel, M., Zhang, S. (2012) Self-assembled photosystem-I biophotovoltaics on nanostructured TiO₂ and ZnO. *Sci. Rep.*, *2*.
- Minagawa, J. (2011) State transitions—The molecular remodeling of photosynthetic supercomplexes that controls energy flow in the chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, *1807*, 897–905.
- Mntungwa, N., Pullabhotla, V. S., Revaprasadu, N. (2012) Facile Synthesis of Organically Capped CdTe Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotech.*, *12*, 2640–2644.
- Nagata, M., Amano, M., Joke, T., Fujii, K., Okuda, A., Kondo, M., Ishigure, S., Dewa, T., Iida, K., Secundo, F., Amao, Y., Hashimoto, H., Nango, M. (2012) Immobilization and Photocurrent Activity of a Light-Harvesting Antenna Complex II, LHCII, Isolated from a Plant on Electrodes. *ACS Macro Lett.*, *1*, 296–299.
- Novoderezhkin, V. I., Palacios, M. A., van Amerongen, H., van Grondelle, R. (2005) Excitation dynamics in the LHCII complex of higher plants: Modeling based on the 2.72 angstrom crystal structure. *J. Phys. Chem. B*, *109*, 10493–10504.
- 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.
- O'Regan, B., Grätzel, M. (1991) A low-cost, high-efficiency solar cell based on dye-sensitized colloidal TiO₂ films. *Nature*, *353*, 737–740.
- Padidam, M. (2003) Chemically regulated gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, *6*, 169–177.
- Palacios, M. A., Weerd, F. L. de, Ihalainen, J. A., van Grondelle, R., van Amerongen, H. (2002) Superradiance and exciton (de)localization in light-harvesting complex II from green plants? *J. Phys. Chem. B*, *106*, 5782–5787.
- 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.
- Peter, G., Thornber, J. (1991) Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *J. Biol. Chem.*, *266*, 16745–16754.
- 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.
- Peter, L. M. (2011) The Grätzel Cell: Where Next? *J. Phys. Chem. Lett.*, *2*, 1861–1867.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E. (2004) UCSF chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, *25*, 1605–1612.
- 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.
- Reinsberg, D., Booth, P. J., Jegerschold, C., Khoo, B. J., Paulsen, H. (2000) Folding, assembly, and stability of the major light-harvesting complex of higher plants, LHCII, in the presence of native lipids. *Biochemistry*, *39*, 14305–14313.
- Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R., Nann, T. (2008) Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat. Methods*, *5*, 763–775.
- Reynolds, A. M., Sculimbrene, B. R., Imperiali, B. (2008) Lanthanide-binding tags with unnatural amino acids: Sensitizing Tb³⁺ and Eu³⁺ luminescence at longer wavelengths. *Bioconjugate Chem.*, *19*, 588–591.
- 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.
- Roy, P., Kim, D., Lee, K., Spiecker, E., Schmuki, P. (2010) TiO₂ nanotubes and their application in dye-sensitized solar cells. *Nanoscale*, *2*, 45.
- Ruban, A. V., Calkoen, F., Kwa, S. L. S., va Grondelle, R., Horton, P., Dekker, J. P. (1997) Characterisation of LHCII in the aggregated state by linear and circular dichroism spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, *1321*, 61–70.
- Ruban, A. V., Johnson, M. P., Duffy, C. D. (2012) The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, *1817*, 167–181.

- 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-phycoyanin. *Photochem. Photobiol.*, *46*, 427–440.
- Schmitt, F. J., Maksimov, E. G., Hatti, P., Weissenborn, J., Jeyasagar, V., Razjivin, A. P., Paschenko, V. Z., Friedrich, T., Renger, G. (2012) Coupling of different isolated photosynthetic light harvesting complexes and CdSe/ZnS nanocrystals via Förster resonance energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, *1817*, 1461–1470.
- Schreiber, A., Zaitseva, E., Thomann, Y., Thomann, R., Dengjel, J., Hanselmann, R., Schiller, S. M. (2011) Protein yoctowell nanoarchitectures: assembly of donut shaped protein containers and nanofibres. *Soft Matter*, *7*, 2875–2878.
- Selvin, P. R. (1994) Luminescence Energy Transfer Using a Terbium Chelate: Improvements on Fluorescence Energy Transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *91*, 10024–10028.
- Selvin, P. R. (2002) Principles and Biophysical Applications of Lanthanide-Based Pops. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, *31*, 275–302.
- Shelnutt, J. A. (1983) Photoreduction of methylviologen sensitized by dihydroxytin(IV) uroporphyrin. *J. Am. Chem. Soc.*, *105*, 7179–7180.
- Smith, A. W., Nie, S. (2010) Semiconductor nanocrystals: structure, properties, and band gap engineering. *Acc. Chem. Res.*, *43*, 190–200.
- Song, L., Yang, K., Jiang, W., Du, P., Xing, B. S. (2012) Adsorption of bovine serum albumin on nano and bulk oxide particles in deionized water. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, *94*, 341–346.
- 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.
- van Amerongen, H., van Grondelle, R. (2001) Understanding the energy transfer function of LHCI, the major light-harvesting complex of green plants. *J. Phys. Chem. B*, *105*, 604–617.
- Vazquez-Ibar, J. L., Weinglass, A. B., Kaback, H. R. (2002) Engineering a terbium-binding site into an integral membrane protein for luminescence energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *99*, 3487–3492.
- Volkov, A., Dockter, C., Bund, T., Paulsen, H., Jeschke, G. (2009) Pulsed EPR determination of water accessibility to spin-labeled amino acid residues in LHCIb. *Biophys. J.*, *96*, 1124–1141.

Wang, M., Grätzel, C., Zakeeruddin, S. M., Grätzel, M. (2012) Recent developments in redox electrolytes for dye-sensitized solar cells. *Energy Environ. Sci.*, 5, 9394.

Wanowska, J. (2012) Markierung des rekombinanten Lichtsammelkomplexes II mit Hilfe von sequenzspezifisch bindenden, membrangängigen Farbstoffen. *Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Watanabe, T., Honda, K. (1982) Measurement of the Extinction Coefficient of the Methyl Viologen Cation Radical and the Efficiency of Its Formation by Semiconductor Photocatalysis. *J. Phys. Chem.*, 86, 2617–2619.

Werwie, M. (2009) Markierung von LHCII-Mehrfachcysteinmutanten mit Donorfarbstoffen. *Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Werwie, M., Xu, X., Haase, M., Basche, T., Paulsen, H. (2012) Bio serves nano: biological light-harvesting complex as energy donor for semiconductor quantum dots. *Langmuir*, 28.

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-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.

Yu, W. W., Qu, L. H., Guo, W. Z., Peng, X. G. (2003) Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chem. Mater.*, 15, 2854–2860.

Zhan, X., Facchetti, A., Barlow, S., Marks, T. J., Ratner, M. A., Wasielewski, M. R., Marder, S. R. (2011) Rylene and Related Diimides for Organic Electronics. *Adv. Mater.*, 23, 268–284.

Zhang, C. Y., Yeh, H. C., Kuroki, M. T., Wang, T. H. (2005) Single-quantum-dot-based DNA nanosensor. *Nat. mater.*, 4, 826–831.

Zhang, W., Chen, G., Wang, J., Ye, B.-C., Zhong, X. (2009) Design and Synthesis of Highly Luminescent Near-Infrared-Emitting Water-Soluble CdTe/CdSe/ZnS Core/Shell/Shell Quantum Dots. *Inorg. Chem.*, 48, 9723–9731.

Zhang, Y., Zhang, H. Y., Hollins, J., Webb, M. E., Zhou, D. J. (2011) Small-molecule ligands strongly affect the Forster resonance energy transfer between a quantum dot and a fluorescent protein. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13, 19427–19436.

Zhu, H., Lian, T. (2012) Wavefunction engineering in quantum confined semiconductor nanoheterostructures for efficient charge separation and solar energy conversion. *Energy Environ. Sci.*, 5, 9406.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
Cap	Chloramphenicol
Chl	Chlorophyll
DGDG	Digalactosyldiacylglycerin
DHLA	<i>Dihydrolipoic acid</i> , Dihydroliponsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPG	Dipalmitoyl-Phosphatidylglycerin
DSSC	<i>Dye sensitized solar cell</i> , elektrochemische Farbstoff-Solarzelle
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EQE	Externer Quantenwirkungsgrad
EtOH	Ethanol
Eu	Europium
Eu-Mal	Europium-Maleimid
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FTO	<i>Fluorine doped tin oxides</i> , Fluor dotierte Zinnoxide
ggf.	gegebenenfalls
His₆-Tag	Hexahistidin-Sequenz
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IBs	<i>Inclusion Bodies</i> , Einschlusskörperchen
IDA	<i>Iminodiacetic acid</i> , Iminodiessigsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
ITO	Indium-Zinnoxid (<i>indium tin oxide</i>)
LBT	<i>Lanthanide binding tag</i> , Lanthanoid-Affinitätssequenz
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LHCII	<i>Light-harvesting complex II</i> , Lichtsammelkomplex II
LM	Laurylmaltosid (n-Dodecyl- β -D-Maltosid)
LRET	Lumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer
Ls	Lösungsmittel
Mal	Maleimid
β -ME	β -Mercaptoethanol
MeOH	Methanol
MPA	Mercaptopropionsäure
MPI-P	Max-Planck-Institut für Polymerforschung
MV	Methylviologen
NADPH	Nicotinamid-Adenindinucleotid-phosphat (reduziert)

NaP	Natriumphosphat
n.a.	nicht angegeben
NaBO	Natriumborat
NPQ	<i>Non photochemical Quenching</i> , Nicht-photochemische Energielöschung
p.A.	<i>pro analysis</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PG	siehe DPPG
POPG	1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-glycero-3-(Phospho-rac) 1-glycerol
PS I/II	Photosystem I/II
QD	<i>Quantum Dot</i> , Halbleiternanokristall
qE	<i>energy dependant quenching</i> , schnellste Komponente des NPQ
R₀	Försterradius
rel. E.	relative Einheiten
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natrium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tb	Terbium
Tb-Mal	Terbium-Maleimid
TCaEP	Triscarboxyethylphosphin
TCyEP	Triscyanoethylphosphin
TDI _{Gs}	Terylene-Diimid-Glutarsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMIMA	Terrylen-Monoimid-Monoanhydrid
TOPO	Trioctyl-Phosphinoxid
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumenprozent
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewichtsprozent
ZnS	Zinksulfid

7.2 Sequenzen

Abgebildet ist die Basen- und Aminosäuresequenz der LHCII-Variante C3.2h (Kosemund, 1999). Die übereinstimmende Basensequenz des ΔN11h (=1h.19h) mit dem C3.2h ist grün hinterlegt, die Übereinstimmung von ΔN11/S34C/S160C mit dem C3.2h ist unterstrichen. Abweichungen in der Sequenz vom C3.2h sind in Reihe 3 und 4 gekennzeichnet (grün für ΔN11h, unterstrichen für ΔN11/S34C/S160C).

1	ATG CGT AAA TCT GCT ACC ACC AAG AAA GTA GCG AGC TCT GGA AGC	45
1	Start R K S A T T K K V A S S G S	15
	AGA	
	R	<u>TCC</u> S
46	CCA TGG TAC GGA CCA GAC CGT GTT AAG TAC TTA GGC CCA TTC TCC	90
16	P W Y G P D R V K Y L G P F S	30
91	GGT GAG TCT CCA TCC TAC TTG ACT GGA GAG TTC CCC GGT GAC TAC	135
31	G E S P S Y L T G E F P G D Y	45
	<u>TGC</u> C	
136	GGT TGG GAC ACT GCC GGA CTC TCT GCT GAC CCA GAG ACA TTC TCC	180
46	G W D T A G L S A D P E T F S	60
181	AAG AAC CGT GAG CTT GAA GTC ATC CAC TCC AGA TGG GCT ATG TTG	225
61	K N R E L E V I H S R W A M L	75
226	GGT GCT TTG GGA TGT GTC TTC CCA GAG CTT TTG TCT CGC AAC GGT	270
76	G A L G C V F P E L L S R N G	90
271	GTT AAA TTC GGC GAA GCT GTG TGG TTC AAG GCA GGA TCT CAA ATC	315
91	V K F G E A V W F K A G S Q I	105
316	TTT AGT GAG GGT GGA CTT GAT TAC TTG GGC AAC CCA AGC TTG GTC	360
106	F S E G G L D Y L G N P S L V	120
361	CAT GCT CAA AGC ATC CTT GCC ATA TGG GCC ACT CAG GTT ATC TTG	405
121	H A Q S I L A I W A T Q V I L	135
406	ATG GGA GCT GTC GAA GGT TAC CGT ATT GCC GGT GGG CCT CTC GGT	450
136	M G A V E G Y R I A G G P L G	150
451	GAG GTG GTT GAT CCA CTT TAC CCA GGT GGA AGC TTT GAT CCA TTG	495
151	E V V D P L Y P G G S F D P L	165
	<u>TGC</u> C	
496	GGC TTA GCT GAT GAT CCA GAA GCA TTC GCA GAA TTG AAG GTG AAG	540
166	G L A D D P E A F A E L K V K	180
541	GAA CTC AAG AAC GGT AGA TTA GCC ATG TTC TCA ATG TTT GGA TTC	585
181	E L K N G R L A M F S M F G F	195
586	TTC GTT CAA GCT ATT GTA ACT GGA AAG GGT CCT TTG GAG AAC CTT	630
196	F V Q A I V T G K G P L E N L	210
631	GCT GAT CAT CTT GCA GAC CCA GTC AAC AAC AAT GCA TGG TCA TAT	675
211	A D H L A D P V N N N A W S Y	225
676	GCC ACC AAC TTT GTT CCC GGA AAA CAC CAT CAC CAT CAC CAT TAA	720
226	A T N F V P G K H H H H H H Stopp	

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen in der Arbeit verwendet habe.

Mainz,

Mara Werwie