

Funktionelle Synthese des Lichtsammelkomplexes II in Polymermembran-Architekturen

Thomas Zapf, Cherrng-Wen Darren Tan, Tobias Reinelt, Christoph Huber, Ding Shaohua, Susana Geifman-Shochat, Harald Paulsen und Eva-Kathrin Sinner*

Abstract: Eines der wirkungsvollsten Konzepte der Natur ist die Aufnahme und Umwandlung von Sonnenenergie durch den Lichtsammelkomplex II (LHCII). Dieser Protein-Pigment-Komplex mit seinen zugehörigen Pigmenten ist der Hauptsonnenenergiekollektor in Pflanzen. Unser Ziel ist es, ein stabiles, reproduzierbares und ressourcenschonendes LHCII-Pigment-Material außerhalb der pflanzlichen Zelle zu generieren, das genauso bereit und in der Lage zur Aufnahme von Sonnenenergie ist. Wir verwendeten dafür ein konventionelles, zellfreies Proteinsynthesesystem aus Weizenkeimen und beobachteten eine cotranslationale Insertion von LHCII-Proteinen in die Polymermembranen, die als Polymersomen der Synthesemischung zugegeben worden waren. Eine einheitliche Insertionsrichtung der Proteine in den Polymermembranen konnten wir durch einen Protease-Assay nachweisen. Die Gegenwart des LHCII bewirkte einen Anstieg der Chlorophyllkonzentration in den Polymermembranen, und die Oberflächenplasmonen-verstärkte Fluoreszenzspektroskopie (SPFS) ermöglichte die Messung des Energietransfers von Chl b nach Chl a, was als Indikator für die native Faltung des LHC-Proteins gilt.

Der Lichtsammelkomplex II (LHCII) höherer Pflanzen ist eines der häufigsten Membranproteine. Ein LHCII-Protein bindet 14 Chlorophyll- (acht Chl a, sechs Chl b) und 4 Carotinoidmoleküle.^[1] LHCII fungiert als Antennenkomplex und ist eines der wenigen Membranproteine, die spontan in vitro rückgefaltet werden können; allerdings kommt es dabei zu einer ungerichteten, zufälligen Insertion in die entsprechende

Membranumgebung.^[2-4] LHC II ist ein interessantes Untersuchungsobjekt in der Membranproteinforschung und hat eine mögliche biotechnologische Bedeutung als „Organisator“ von Farbstoffen im Kontext von nachhaltigen, robusten und effizienten Solarzellen.^[5] Bisherige LHCII-bezogene Ansätze sind abhängig von der Verfügbarkeit von Detergenz gereinigten LHC-Proteinen, die in relativ instabilen Lipidmembranen ohne Vorzugsrichtung rekonstituiert werden oder aus Isolaten von Thylakoidextrakten stammen.^[6,7]

Die In-vitro-Membran-unterstützte (assisted) Proteinsynthese (iMAPS), auch als „zellfreie“ Expressionsstrategie beschrieben, in Kombination mit künstlichen Membranmaterialien wird von uns als eine robuste und zuverlässige Technik für eine De-novo-Synthese von Membranproteinen vorgestellt, wie es für GPCRs,^[8] Claudin-2^[9] und weitere sehr verschiedenartige Membranproteine^[10,11] bereits gezeigt wurde. Jüngste Versuche, konventionelle Lipidmembranen durch Polymermembranen zu ersetzen, ergeben eine weitere interessante Perspektive, da die Letztgenannten definierte, reproduzierbare und vor allem chemisch und physikalisch robuste Membranarchitekturen aufweisen.^[12] Wir haben uns für Polymermembranen aus amphiphilen Diblockcopolymeren entschieden, da diese in wässriger Umgebung Lipidmembran-ähnliche Doppelschichten bilden.^[12-14] Die Polymermembranen sind leicht variierbar in Bezug auf ihre Dicke, Durchlässigkeit und Steifheit gemäß der Auswahl an unterschiedlichen Polymerbausteinen.^[14] Die Verwendung der zellfreien Proteinsynthese mit diesen Polymermembranen ermöglicht die De-novo-Synthese von Membranproteinen in eine Membranarchitektur, mit dem Vorteil, dass diese frei vom Einfluss zellulärer Regulationsmechanismen ist und die Membranproteine keiner Detergenz-basierten und damit denaturierenden Aufreinigungsprozedur ausgesetzt werden.^[9,11,15,16]

Hier zeigen wir den gerichteten Einbau von funktionalem LHCII und LHCII-Pigment-Komplexen, eingebaut in so genannte Polymersomen (sphärische Polymervesikel) sowie aus dem gleichen Material bestehende, aber planar auf einer festen Oberfläche organisierten Polymer-Doppelschichten. Das Verfahren der zellfreien Proteinsynthese führt anschließend zu einem cotranslationalen, gerichteten LHCII-Einbau in diese polymeren Membranstrukturen, wie wir es bereits für ein anderes Proteinbeispiel beschrieben haben.^[9] Wir zeigen hier die Selbstorganisation von Polymer-Doppelschichten aus Liponsäure-modifizierten Monomeren, die sich auf planaren Goldoberflächen selbstorganisieren und durch iMAPS mit LHCII funktionell modifiziert werden. Die Methode der Oberflächenplasmonenresonanz(SPR)-Spektroskopie wurde verwendet, um die Membranbildung zu überwachen, wäh-

[*] MSc T. Zapf, Dr. C.-W. D. Tan, T. Reinelt, Dr. C. Huber, Prof. Dr. E.-K. Sinner
Department für Nanobiotechnologie
Institut für Synthetische Bioarchitekturen
Universität für Bodenkultur
Muthgasse 11/2, 1190 Wien (Österreich)
E-Mail: eva.sinner@boku.ac.at

Dr. D. Shaohua
CAS Key Lab of Bio-Medical Diagnostics
Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology
Chinese Academy of Sciences, Suzhou (China)

Prof. Dr. S. Geifman-Shochat
School of Biological Science
Nanyang Technological University (Singapur)

Prof. Dr. H. Paulsen
Institut für allgemeine Botanik
Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Deutschland)

Hintergrundinformationen und ORCIDs der Autoren zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201506304> zu finden.

rend der LHCII-interne Energietransfer von *Chl b* zu *Chl a* durch Oberflächenplasmonen-verstärkte Fluoreszenzspektroskopie (SPFS) gemessen wurde. Die Tatsache des Energietransfers als Konsequenz der *Chl-b*-Anregung durch das exponentiell abklingende Feld der Plasmonen lässt auf eine native Faltung der LHCII-Einheiten in der Polymermembran und damit auf eine funktionale Präsentation der Chlorophyllmoleküle durch das Strukturprotein LHCII schließen.

Die Synthese und die Integration des LHCII-Apoproteins in Polymermembranen wurden im Weizenkeim-Zelllysat als geeignetem Expressionssystem (Promega, L4140) erreicht. Der Einfluss der Polymerkonzentration auf die LHCII-Expressionseffizienz wurde unter Verwendung von SDS-PAGE, gefolgt von Western Blot (Abbildung 1 A), analysiert. Wir beobachteten stabile LHCII-Expressionsniveaus bis zu einer Konzentration von $0.5 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$ an zugegebenem Polymermaterial pro Zelllysatsatz (Abbildung 1 B). Wir vermuten, dass das optimale Verhältnis von Polymersomen zu Zelllysat durch einen molekularen Verdrängungseffekt bestimmt ist, der, falls richtig gewählt, die Genexpression in zellfreien Systemen^[17] robuster machen kann. Eine weitere Rolle bei der Syntheseeffizienz spielt auch das Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis, wie wir im mikrofluidischen System nachweisen konnten.^[18] Bei hohen Polymersomkonzentrationen sinkt die Expressionseffizienz jedoch, wahrscheinlich wegen negativer Verdünnungseffekte.

Das Vorhandensein, die Organisation, die Menge und die Lokalisierung von LHCII in den Polymerstrukturen wurden durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) visuali-

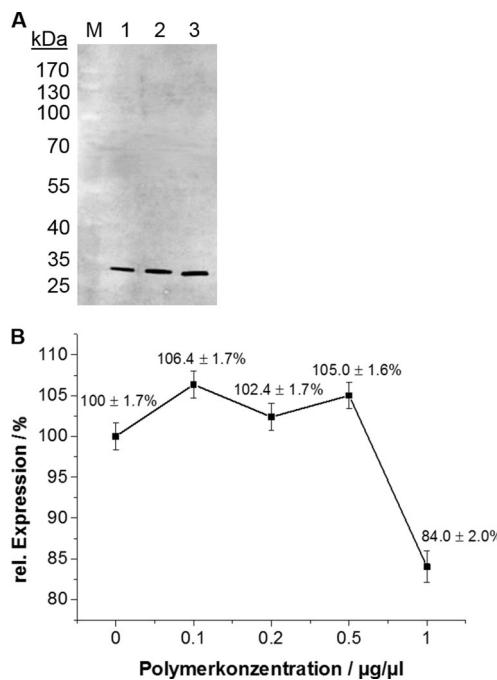


Abbildung 1. Expressionseffizienzen von LHCII in der Gegenwart von Polymersomen. A) Western Blot von LHCII in An-/Abwesenheit von Polymersomen. Spur 1 zeigt die Expression von N-VSVG-LHCII alleine, Spur 2 N-VSVG-LHCII mit $0.2 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$ Polymersomen und Spur 3 C-VSVG-LHCII mit Polymersomen. B) Relative Proteinexpression in Abhängigkeit von der Polymerkonzentration in Bezug auf die Signalintensität. ($n=3$).

siert. Polymersomen mit integrierten LHCII-Komplexen, so genannten Proteopolymersomen (PPs), wurden, wie von Nallani et al. beschrieben, gereinigt.^[9] Die resultierenden PPs wurden auf zwei Arten markiert: 1) Membranpräparation und iMAPS-generiertes Protein wurden sowohl durch 1% Uranylacetat und anschließend 1% OsO₄ als auch durch Immungold-markierten Antikörper gegen LHCII kontrastiert (Abbildung 2 A). 2) Alternativ wurden die Polymermembranen nur mit OsO₄ kontrastiert, was wiederum die vorhandenen Proteine als weiße Punkte erscheinen lässt (Abbildung 2 B). In beiden Präparationsmethoden zeigte sich

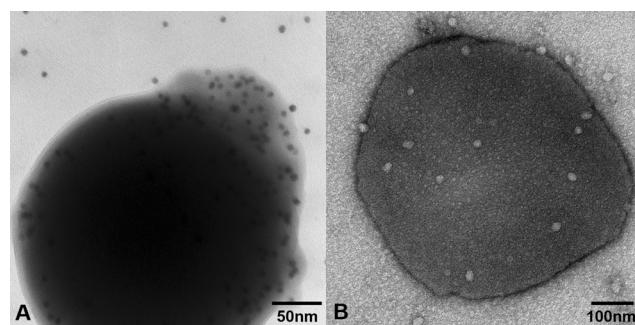


Abbildung 2. TEM-Aufnahmen von durch Zentrifugation-Mikrofiltration gereinigten LHCII-PPs. A) Sphärisches Polymersom mit Immungold-markiertem LHCII. B) Verformtes Polymersom nach OsO₄-Kontrastierung; weiße Punkte: ungefärbte LHCII-Protein(anordnungen).

die Tendenz zur Verformung der PPs. Zur Minimierung dieses Effekts wurden die Polymersomen bereits bei der Herstellung mit 0.4M Trehalose gefüllt, einer etablierten Methode zur Erhöhung der Stabilität solcher Strukturen.^[19]

Die tatsächliche Integration von LHCII in die Polymersomen wurde durch eine Kombination von Immunpräzipitation^[20] und Natriumcarbonatextraktion bestätigt,^[21] wie von Fujiki et al. beschrieben. Dabei wurden nur geringfügige Anpassungen und Modifikationen in der Vorgehensweise vorgenommen (siehe Hintergrundinformationen). Entsprechend der Vorschrift von Fujiki et al. führt ein stark ionischer Puffer zur Ablösung rein assoziierter, jedoch nicht in eine Membran integrierter Proteine. Proteine, die vollständig in die Membran integriert sind, wie Membranproteine einer Zelle, wären insofern resistent gegen eine solche Behandlung. Unsere Polymersomen wurden mit Silicatnanopartikeln (SiNPs), modifiziert mit Anti-Polyethylenglycol(α -PEG)-Antikörpern, aufgereinigt, wie zuvor von unserer Arbeitsgruppe^[20] beschrieben, wobei vollständig integrierter LHCII vom verwendeten Zelllysat abgetrennt wurde. Dies ist möglich, da die α -PEG-Antikörper in der Lage sind, an den Polyethylenoxidanteil des Polymers zu binden. In Abbildung 3 ist ein exemplarisches Ergebnis dieser Aufreinigung dargestellt, wobei die Natriumcarbonat-behandelte Probe zeigt, dass der mittels iMAPS synthetisierte LHCII vollständig in die Polymermembran integriert ist. Der Verlust der Signalstärke wird durch die zusätzliche Behandlung verursacht. Dieses auf Antikörpern basierende SiNP-Reinigungsverfahren ermöglicht die Aufkonzentrierung von Membranproteinen sogar aus einer 1000-fachen Verdünnung.

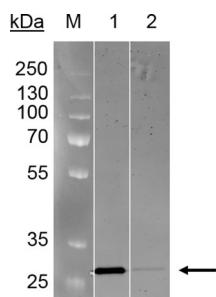


Abbildung 3. Western Blot von SiNP-gereinigten LHCII-PPs nach Natriumcarbonatextraktion. Gleiche Volumina der Reaktionsmischung wurden im Polyacrylamidgel im elektrischen Feld unter Maskierung der Eigenladung durch Natriumdodecylsulfat aufgetrennt und anschließend vom Gel vertikal auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mittels farbmarkiertem Antikörper sichtbar gemacht. Spur 1: α -PEG-SiNP-gereinigte PPs nach zellfreier Synthese; Spur 2: gereinigte PPs, in denen das LHCII-Proteinsignal nach durchgeföhrter Natriumcarbonatextraktion sichtbar geblieben ist.

Ein geeignetes und etabliertes Verfahren, um die LHCII-Ausrichtung in polymeren Membranen näher zu untersuchen, ist der Trypsinverdau. Dabei sind Transmembrandomänen und intrazelluläre/intrapolymeromsomale Bestandteile vor dem Trypsinverdau geschützt. Der VSVG-Tag, der zur Immundetektion verwendet wurde, zeigt zwei Trypsinschnittstellen, während der LHCII insgesamt 21 Schnittstellen aufweist.

Wir verglichen die Fragmentmuster nach Trypsinverdau im Western Blot mit Mustern, die aus einem virtuellen Verdau stammten, generiert mithilfe der Software Peptide-Cutter von Expasy (Abbildung 4B). Das Fragmentmuster in Abbildung 4A zeigt, dass LHCII gerichtet in die Membran eingebaut sein muss, wobei der N-Terminus exponiert wird. Wir erwarteten nämlich, dass in einem korrekt gefalteten und Membran-integrierten LHCII einer der beiden Termini Protease-exponiert ist, während der andere Terminus auf der Membraninnenseite vor der Protease geschützt ist. Immunmarkierungsexperimente ergaben ein genau dieser Hypothese entsprechendes Muster, das für einen geschützten C-Terminus spricht. Insofern finden wir einen durch die iMAPS-Methode in einer Polymermembran korrekt gefalteten LHCII vor. Die Zugabe von Pigmenten führte zu keiner sichtbaren Veränderung des Verdauungsmusters, obwohl Chlorophyll und Carotinoide von wesentlicher Bedeutung für eine vollständige Faltung des LHCII in vivo und in vitro sind.^[22]

Auch wenn die Daten darauf schließen lassen, dass LHCII in die Polymeromsome eingebaut wurde, stellte sich die Frage, ob das Protein weiterhin in der Lage ist, Chlorophyll und Carotinoide zu binden, wie es in den nativen Umgebung einer Thylakoidmembran der Fall ist. Wegen des intrinsisch hydrophoben Charakters von Chlorophyll integrierte sich bereits eine nachweisbare Menge spontan in die Polymermembran – in Abwesenheit von LHCII-Proteinen. Wir stellten die Hypothese auf, dass die Gegenwart von LHCII in der Membran eine massive lokale Ansammlung von Chlorophyllmolekülen zur Folge haben sollte. Daher extrahierten wir Chlorophyll und Carotinoide aus Erbsenblättern und gaben sie während der iMAP-Synthese auf planare Polymermem-

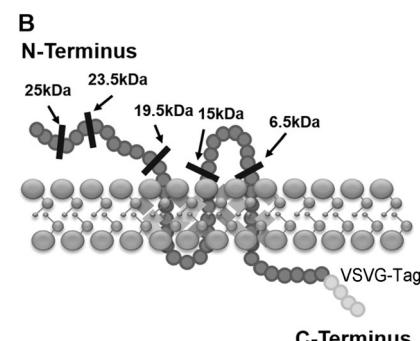
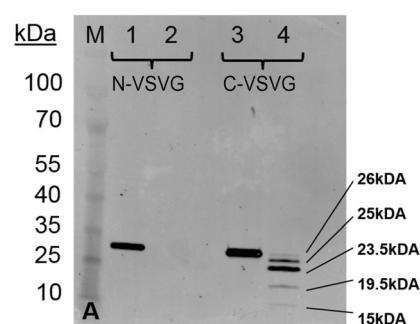


Abbildung 4. A) Gereinigte PPs nach 30 min Trypsinverdau. Spuren 1 und 4: unbehandelte PPs; Spuren 2 und 5: Trypsin-verdaute PPs. Hier zeigt sich ein Fragmentmuster, das für einen geschützten C-VSVG des LHCII spricht. B) C-VSVG-markierter LHCII in der Polymermembran mit Darstellung aller relevanten Trypsinschnittstellen.

branen. Die Proben wurden anschließend auf ihre Fluoreszenzemissionsintensität bei der charakteristischen *Chl-a*-Wellenlänge hin untersucht. Unsere Messungen zeigten eine Zunahme der charakteristischen Chlorophyllfluoreszenzemission in Gegenwart von LHCII, was auf eine LHCII-bedingte Orientierung der Pigmente und somit auf einen physiologischen Zustand der LHCs, wie er in einer Thylakoidmembran vorliegt, schließen lässt.

Im Hinblick auf mögliche technische Anwendungen dieser Polymer-LHCII-Architekturen verlagerten wir unsere Untersuchungen von sphärischen Architekturen hin zu planaren, oberflächengebundenen Polymermembranen. Für eine effiziente und starke Polymerbindung an die Gold-beschichteten SPR-Oberflächen wurde das Polymermaterial mit Lipoinsäure^[23] modifiziert, was eine Bindung durch die Schwefelgruppen an der Goldoberfläche ermöglicht. Proteinsynthese und Pigmentinkubation wurden von uns in zwei getrennte Schritte aufgeteilt. Die Proteinsynthese wurde 4 h bei Raumtemperatur *in situ* durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde iMAPS in Abwesenheit der für LHC kodierenden DNA durchgeführt. Die Doppelschichtbildung und die anschließende Proteininsertion wurden als eine Funktion der optischen Schichtdickenzunahme in einem selbstgebauten SPR-Setup überprüft (Daten nicht gezeigt). Bemerkenswerterweise wurde eine relativ geringe Zunahme der optischen Schichtdicke im Falle einer LHCII-Expression relativ zur Dicke einer „leeren“ Polymermembranarchitektur dokumentiert. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die LHCII-Integration an der Einbaustelle eine unspezifische

Adsorption verringert, während im Falle einer „leeren“ Membran unspezifische Anlagerungen omnipräsent sind. Insofern sind die reinen Schichtdickenanalysen nur wenig aussagekräftig, was die Inkorporation der LHCII-Moleküle in die Polymermatrix betrifft.

Oberflächenplasmonen, die *Chl b* anregen können, wurden durch einen HeNe-Laser ($\lambda = 632.8$ nm) erzeugt. *Chl a* und *b* werden in einem nativ gefalteten LHCII derart orientiert, dass die Energie von *Chl b* immer zu einem benachbarten *Chl a* weitergegeben wird, wo es als Photon einer Wellenlänge von $\lambda = 670$ nm emittiert wird. Genau diese Emission wurde in LHCII-Pigment-funktionalisierten Polymermembranen beobachtet (Abbildung 5).

Um die spezifische Chlorophyll-Bindungswirkung von LHCII in der Membran zu bewerten, verwendeten wir das alternative Membranprotein Claudin2 (Cldn2) als Referenzprotein menschlichen Ursprungs ohne bekannte Affinität für Chlorophyll. In Gegenwart von LHCII stieg die *Chl-a*-Fluoreszenz nach *Chl-b*-Anregung signifikant an, während in der Vergleichsmessung in Gegenwart von Cldn2 die Emission abnahm (Abbildung 6). Dieser Befund zeigt, dass die Zunahme der *Chl-a*-Fluoreszenz durch die Anordnung der Pigmente in Gegenwart von LHCII bedingt ist. Des Weiteren wurde die Regenerierbarkeit der Fluoreszenzemission nach

photoinduziertem Bleichen der Chlorophyllmoleküle durch deren Austausch erreicht, was unser System wiederverwendbar macht. Dies stellt eine neue Eigenschaft gegenüber den standardmäßigen Lipid- oder Detergenz-basierten LHC-haltigen Ansätzen dar.

Wir konnten hier die Eignung von robusten Polymermembranen für den gerichteten LHCII-Einbau demonstrieren, der sowohl in sphärischen als auch in planaren Polymermembranen direkt aus der Proteintranslation heraus erfolgte. Die native Anordnung und Bindung von Chlorophyllmolekülen durch LHCII wurde durch Fluoreszenzemission in der SPFS-Konfiguration nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen, dass iMAPS-generierte LHCII-Komplexe funktionell in die robuste Polymermembran eingebaut werden und dass zusätzlich die Möglichkeit besteht, gebleichtes Chlorophyll durch neues Pigment infolge einfacher Pigmentzugabe zu ersetzen. Des Weiteren konnten wir nachweisen, dass iMAPS-generierter LHCII in der Lage ist, Pigmente entsprechend seines natürlichen Ebenbildes in einer natürlichen Zellmembran zu positionieren. Diese Resultate stellen einen weiteren Schritt für die Nutzung von Sonnenenergie durch biologisch inspirierte, robuste und wiederverwendbare Materialien dar.

Experimentelles

Polybutadien₁₂₀₀-Polyethylenoxid₆₀₀ (PolymerSource) wurde entweder allein oder zusammen mit Pigmentextrakt in Chloroform ($\geq 99\%$, Roth) gelöst, und Polymermosen wurden durch Filmrehydrierung^[24] und anschließende Extrusion gebildet. Pigmente wurden extrahiert, wie von Paulsen et al. beschrieben.^[6] Polymer wurde mit Liponsäure modifiziert, wie von Belegrinou et al. beschrieben.^[23]

Proteine und PPs wurden mit TNT-Weizenkeim-Extrakt-Kit (Promega, L4140) hergestellt. Proteine wurden sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Pigmentextrakt exprimiert. Für die Verdauungsexperimente wurde Trypsin (0.5 % Trypsin-EDTA, Gibco) verwendet. Monoklonale Maus-Anti-VSVG-Antikörper (Sigma-Aldrich; VSVG = vesikuläres Stomatitisvirus-Glykoprotein) wurden als primäre Antikörper verwendet, und infrarotmarkiertes Ziege-Anti-Maus-IgG (IRDye 800CW, Licor) wurde als sekundärer Antikörper eingesetzt. Die Antikörperfertigung erfolgte mit dem Odyssey Infrared Imaging System (Licor).

Für TEM-Analysen wurde ein Hase-Anti-LHCII-Antikörper ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) als primärer Antikörper genutzt, und Immungold-markierter, sekundärer Ziege-anti-Hase-Antikörper (5 nm kolloidales Gold, Sigma) wurde als sekundärer Antikörper verwendet. Des Weiteren wurden Uranylacetat und OsO₄ zur Kontrastierung verwendet. Ein weiterer Ansatz bestand darin, gereinigte Poly-

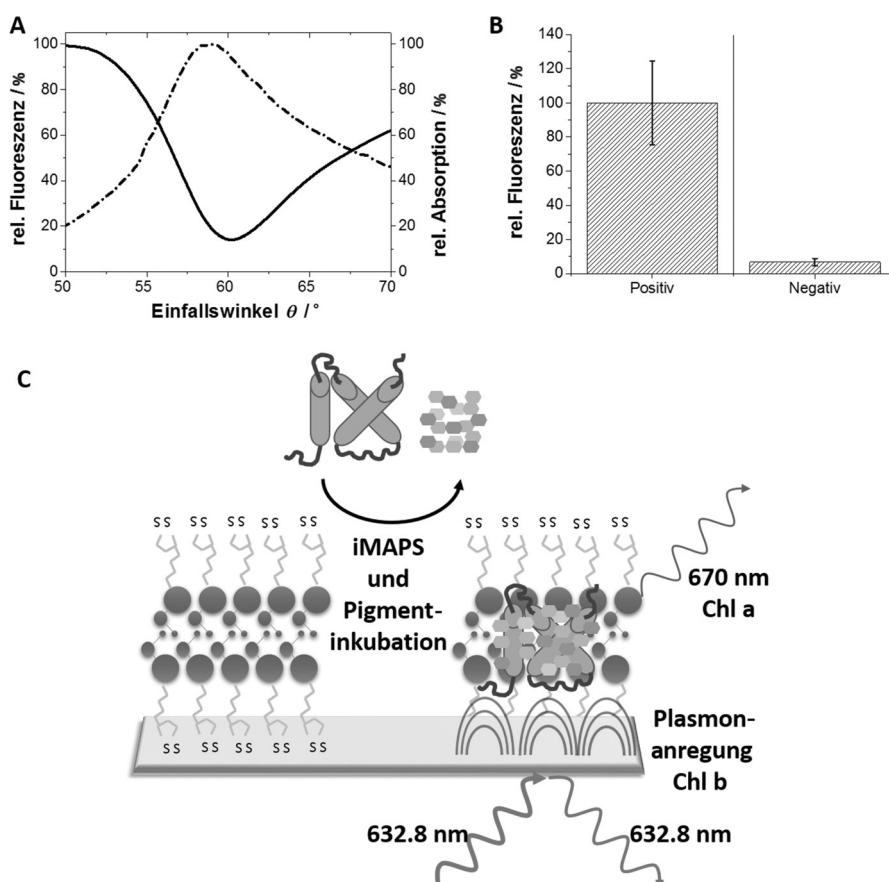


Abbildung 5. Oberflächenplasmon-induzierter Energietransfer von *Chl b* zu *Chl a*. A) Exemplarischer Energietransfer innerhalb einer LHCII-modifizierten und an eine Goldoberfläche gebundenen Polymermembran. B) Vergleich der durchschnittlichen *Chl-a*-spezifischen Fluoreszenz bei *Chl-b*-Anregung von Polymermembranen in An- und Abwesenheit von LHCII ($n=4$). C) Oberflächenmodifizierung und Energietransfer in Gegenwart von LHCII.

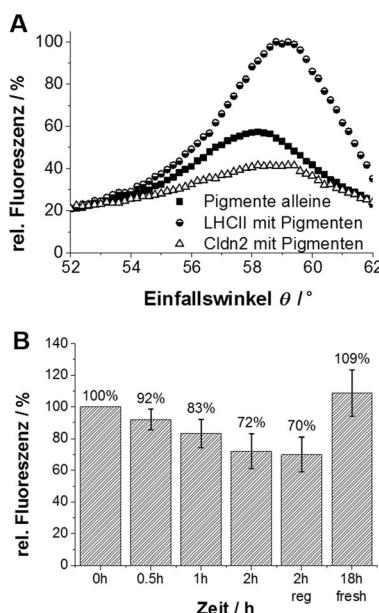


Abbildung 6. A) Eine vergleichende Analyse von LHCII und Cldn2 zeigt, dass LHCII notwendig für die Neuorientierung der Chlorophyllmoleküle und dementsprechend ausschlaggebend für den Energietransfer von *Chl b* zu *Chl a* ist ($n=3$). B) Wiederherstellung der Fluoreszenzemission nach Bleichen der Chlorophyllmoleküle durch Inkubation mit frischem Pigmentextrakt ($n=4$).

mersomembran schlicht mit OsO₄ zu färben, wobei Proteine ungefärbt blieben.

Die PP-Aufreinigung wurde sowohl durch Zentrifugalmikrofiltration (Ultrafree-MC-VV, Durapore PVDF 0.1 μm)^[9] als auch durch SiNP-Immunpräzipitation^[20] erreicht. Im Falle der Oberflächengebundenen Polymer-Doppelschichten wurden Gold-beschichtete (50 nm) Glasoberflächen verwendet und SPR/SPFS-Experimente mit einem selbstgebaute Setup durchgeführt. Fluoreszenzmessungen erfolgten mit einem Luminescence Spectrometer (LS 55, PerkinElmer Instr.).

Danksagung

Wir danken dem Bundesministerium für Verkehr, Innovation und Technologie (Österreich) für die finanzielle Unterstützung der International Graduate School in BioNanoTech Programmes. Des Weiteren bedanken wir uns bei Prof. Walter Hunziker, ASTAR (Singapur), für die Bereitstellung der cDNA von Cldn2 als Referenzprotein sowie bei Christoph Zaba (Universität für Bodenkultur Wien) für die Synthese des Liponsäure-modifizierten Polymers.

Stichwörter: Lichtsammelkomplex · Membranen · Membranproteinexpression · Proteine · Synthetische Polymermembranen

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 14664–14668
Angew. Chem. **2015**, *127*, 14875–14879

- [1] Z. Liu, H. Yan, K. Wang, T. Kuang, J. Zhang, L. Gui, X. An, W. Chang, *Nature* **2004**, *428*, 287–292.
- [2] D. Reinsberg, P. J. Booth, C. Jegerschöld, B. J. Khoo, H. Paulsen, *Biochemistry* **2000**, *39*, 14305–14313.
- [3] C. Yang, R. Horn, H. Paulsen, *Biochemistry* **2003**, *42*, 4527–4533.
- [4] C. Yang, S. Boggasch, W. Haase, H. Paulsen, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2006**, *1757*, 1642–1648.
- [5] N. S. Lewis, D. G. Nocera, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15729–15735.
- [6] H. Paulsen, U. Rümler, W. Rüdiger, *Planta* **1990**, *181*, 204–211.
- [7] A. Mershin, K. Matsumoto, L. Kaiser, D. Yu, M. Vaughn, M. K. Nazeeruddin, B. D. Bruce, M. Graetzel, S. Zhang, *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 234.
- [8] S. May, M. Andreasson-Ochsner, Z. Fu, Y. X. Low, D. Tan, H.-P. M. de Hoog, S. Ritz, M. Nallani, E.-K. Sinner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 749–753; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 777–781.
- [9] M. Nallani, M. Andreasson-Ochsner, C.-W. D. Tan, E.-K. Sinner, Y. Wisantoso, S. Geifman-Shochat, W. Hunziker, *Biointerphases* **2011**, *6*, 153–157.
- [10] R. Sachse, S. K. Dondapati, S. F. Fenz, T. Schmidt, S. Kubick, *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 2774–2781.
- [11] A. Nozawa, T. Ogasawara, S. Matsunaga, T. Iwasaki, T. Sasaki, Y. Endo, *BMC Biotechnol.* **2011**, *11*, 35.
- [12] B. M. Discher, Y. Y. Won, D. S. Ege, J. C. Lee, F. S. Bates, D. E. Discher, D. A. Hammer, *Science* **1999**, *284*, 1143–1146.
- [13] M. Antonietti, S. Förster, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1323–1333.
- [14] R. Rodríguez-García, M. Mell, I. López-Montero, J. Netzel, T. Hellweg, F. Monroy, *Soft Matter* **2011**, *7*, 1532–1542.
- [15] G. Ishihara, M. Goto, M. Saeki, K. Ito, T. Hori, T. Kigawa, M. Shirouzu, S. Yokoyama, *Protein Expression Purif.* **2005**, *41*, 27–37.
- [16] M. A. Goren, B. G. Fox, *Protein Expression Purif.* **2008**, *62*, 171–178.
- [17] C. Tan, S. Saurabh, M. P. Bruchez, R. Schwartz, P. Leduc, *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 602–608.
- [18] K. S. Dresse, D. Latta, A. Murr, M. Ritzl-Lehnert, E. K. Sinner (Google Patents), US 20130203110A1, **2013**.
- [19] D. Christensen, C. Foged, I. Rosenkrands, H. M. Nielsen, P. Andersen, E. M. Agger, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2007**, *1768*, 2120–2129.
- [20] T. Zapf, C. Zafiu, C. Zaba, C.-W. D. Tan, W. Hunziker, E.-K. Sinner, *Biomater. Sci.* **2015**, DOI: 10.1039/C5M00133A.
- [21] Y. Fujiki, A. L. Hubbard, S. Fowler, P. B. Lazarow, *J. Cell Biol.* **1982**, *93*, 97–102.
- [22] H. Paulsen, B. Finkenzeller, N. Kühlein, *Eur. J. Biochem. FEBS* **1993**, *215*, 809–816.
- [23] S. Belegrinou, J. Dorn, M. Kreiter, K. Kita-Tokarczyk, E.-K. Sinner, W. Meier, *Soft Matter* **2010**, *6*, 179–186.
- [24] M. Traïkia, D. E. Warschawski, M. Recouvreur, J. Cartaud, P. F. Devaux, *Eur. Biophys. J.* **2000**, *29*, 184–195.

Eingegangen am 8. Juli 2015,
veränderte Fassung am 28. Juli 2015
Online veröffentlicht am 16. Oktober 2015