



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Spektro-elektrochemische Untersuchungen des
photosynthetischen Reaktionszentrum (RC) aus
Rhodobacter sphaeroides in einer biomimetischen
Membranumgebung“

Verfasser

Vedran Nedelkovski

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 411

Studienrichtung lt. Studienblatt: Physik

Betreuerin / Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang Knoll



Die vorliegende Arbeit wurde am Austrian Institute of Technology – AIT in Wien im Zeitraum zwischen August 2011 und August 2012 angefertigt.

Diese Diplomarbeit ist meinen Eltern gewidmet, die mein Studium in Wien ermöglicht haben.

Abstract – Deutsch

Das photosynthetische Reaktionszentrum (RC) aus dem schwefelfreien Purpurbakterium *Rhodobacter sphaeroides* wurde in das ptBLM-System (s. 3.3) auf einer Goldoberfläche rekonstituiert. Für die SPR und EIS Messungen wurde das ptBLM-System auf einer TSG-Oberfläche aufgebaut, während für die SEIRAS-Messungen die two-layer Goldoberfläche verwendet wurde (s. 7.A). Die Anbindung des Proteins auf der Goldoberfläche und die anschließende Rekonstitution in die ptBLM wurde mittels SPR verfolgt und mittels EIS überprüft. Die Lichtanregung des RC wurde mittels SEIRAS untersucht. Einige prominente Banden wurden beobachtet, die auf die Lichtanregung des speziellen Paares (s. 3.1), sowie auf die Änderung der Chinon/Hydrochinon Spezies hinwiesen. Hell minus dunkel Differenz-SEIRA-Spektren wurden dann aufgenommen, in Abhängigkeit von der Zeit, bei kontinuierlicher Belichtung ohne und mit fettlöslichem, in die ptBLM ko-rekonstituiertem Coenzym Q₁₀. Markerbanden der Lichtanregung konnten somit identifiziert und zugeordnet werden. Weiters wurde das RC gemeinsam mit dem *bc*₁-Komplex, beide aus *Rb. sphaeroides*, in die ptBLM ko-rekonstituiert. Die Bandenzuordnung wurde wieder durch Ko-rekonstitution des fettlöslichen Q₁₀ in die Lipidphase ermöglicht. Änderungen in den SEIRA-Spektren wurden beobachtet, vor allem nach Zugabe von Cytochrom *c*, was auf eine Interaktion dieser beiden Proteine über den sogenannten Chinon/Hydrochinon Pool in der Lipidphase hindeutete.

Abstract – English

The photosynthetic reaction center (RC) from the purple non-sulfur bacterium *Rhodobacter sphaeroides* has been immobilized onto a gold surface and subsequently reconstituted in the ptBLM (s. 3.3). SPR and EIS measurements of the ptBLM-System were conducted on a TSG surface, while a two-layer gold surface was used for SEIRAS measurements (s. 7.A). Immobilization of the protein and subsequent reconstitution in the ptBLM was monitored by SPR and EIS. Light activation of the RC was analyzed by SEIRAS. A number of very strong bands have been observed indicating the light-excitation of the special pair (s. 3.1) as well as alterations of quinone/quinol species. Light minus dark difference SEIRA spectra were recorded as a function of time under continuous illumination, with and without liposoluble coenzyme Q₁₀ co-reconstituted in the ptBLM. Marker bands of photo-excitation could thus be identified. Furthermore, RC and the *bc*₁-complex, both from *Rb. sphaeroides* have been simultaneously co-reconstituted in the ptBLM. Band assignment was again facilitated by co-reconstitution of liposoluble Q₁₀ into the lipid phase. Changes of the SEIRA spectra were observed, particularly after addition of cytochrome *c*, indicating the interaction of the RC with the *bc*₁-complex via the quinone/quinol pool.

INHALTSVERZEICHNIS

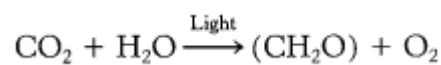
1. EINLEITUNG	3
2. MOTIVATION	6
3. MEMBRANPROTEINE	8
3.1 Das photosynthetische Reaktionszentrum (RC)	9
3.2 Die Coenzym Q : Cytochrom <i>c</i> Oxidoreduktase (<i>bc</i> ₁ -Komplex)	15
3.3 Die Protein-verankerte Lipid-Membran (ptBLM).....	19
4. THEORETISCHE GRUNDLAGEN UND MESSMETHODEN	22
4.1 Infrarotspektroskopie	22
4.1.1 ATR-FTIR Spektroskopie.....	26
4.1.2 Oberflächenverstärkte ATR-FTIR Spektroskopie (SEIRAS)	31
4.1.3 Infrarotspektroskopie an Proteinen	33
4.2 Elektrochemische Impedanz Spektroskopie (EIS)	36
4.3 Surface Plasmon Resonance (SPR) Spektroskopie	41
5. RESULTATE UND DISKUSSION	47
5.1 Immobilisierung und Rekonstitution des RC in die ptBLM.....	47
5.1.1 Verfolgung mittels SPR	47
5.1.2 Überprüfung mittels EIS	49
5.1.3 Ko-rekonstitution des RC mit dem <i>bc</i> ₁ -Komplex	50
5.2 Die Lichtanregung	52
5.2.1 SEIRAS von RC in der ptBLM.....	52
Immobilisierung des RC auf der two-layer Goldoberfläche	52
Markerbanden der Lichtaktivierung des RC	53
5.2.2 SEIRAS von RC korekonstituiert mit dem <i>bc</i> ₁ -Komplex in der ptBLM.....	60
Ko-immobilisierung des RC mit dem <i>bc</i> ₁ -Komplex auf der two-layer Goldoberfläche	60
Interaktion der zwei Proteine.....	60
6. CONCLUSIO UND AUSSICHT	66

7. ANHANG.....	68
A. Probenpräparation	68
A.1 Präparation ultraflacher Goldoberflächen (TSG)	68
A.2 Präparation der SPR-Messzelle	69
A.3 Präparation des ATR-Kristalls	70
B Chemikalien und Lösungen.....	72
C Messinstrumente	74
D Verwendete Proteine.....	75
E Curriculum Vitae	76
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	77

1. Einleitung

Photosynthese (griech. φῶς -Licht; σύνθεσις, *synthesis*, Zusammensetzung) bezeichnet die Erzeugung von energiereichen Stoffen aus energieärmeren Stoffen mit Hilfe von Lichtenergie. Sie wird von Pflanzen, Algen und einigen Bakteriengruppen betrieben.

Die gesamte von biologischen Systemen genutzte freie Energie stammt von der Solarenergie, die durch den Prozess der Photosynthese genutzt wird. Die chemische Grundreaktion ist ganz einfach¹⁰. Wasser und Kohlenstoffdioxid reagieren miteinander um Kohlenhydrate und molekularen Sauerstoff zu produzieren.



In dieser Reaktion stellt (CH₂O) ein Kohlenhydrat dar. Der Mechanismus der Photosynthese ist komplex und benötigt eine Koordination von vielen Proteinen und kleinen Molekülen. Bei diesem biochemischen Vorgang wird zunächst mit Hilfe von lichtabsorbierenden Farbstoffen, Chlorophylle bei Pflanzen (in Chloroplasten) und Bacteriochlorophylle bei Bakterien (in Chromatophoren= invaginierte Teile der Zellmembran, die die Photosynthesepigmente tragen), die Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt. Diese wird dann unter anderem zur Fixierung von Kohlenstoffdioxid verwendet: aus energiearmen, anorganischen Stoffen, Kohlenstoffdioxid CO₂ und Wasser H₂O, werden dabei energiereiche organische Verbindungen - Kohlenhydrate - synthetisiert.

Die Menge der durch Photosynthese gespeicherten Energie ist enorm. Mehr als 10¹⁷ kcal freie Energie wird pro Jahr durch Photosynthese auf der Erde gespeichert¹⁰. Das entspricht einer Umwandlung von mehr als 10¹⁰ Tonnen Kohlenstoff in Kohlenhydrate und andere Formen der organischen Materie. Somit ist die Photosynthese die essenzielle Quelle aller Kohlenstoffverbindungen und Sauerstoff, die ihrerseits den aeroben Metabolismus der Zelle ermöglichen.

Die Möglichkeit Licht einzufangen ist die Schlüsseleigenschaft der Photosynthese. Die erste Reaktion ist die Absorption von Licht durch ein lichtabsorbierendes Molekül (Photorezeptor). Der primäre Photorezeptor in den meisten Pflanzen ist ein Chlorophyll bzw. Bacteriochlorophyll bei den Bakterien. Die Stickstoffatome der 4 Pyrrole bilden eine sogenannte Komplexverbindung mit einem Magnesium Ion (Abb. 1.1).

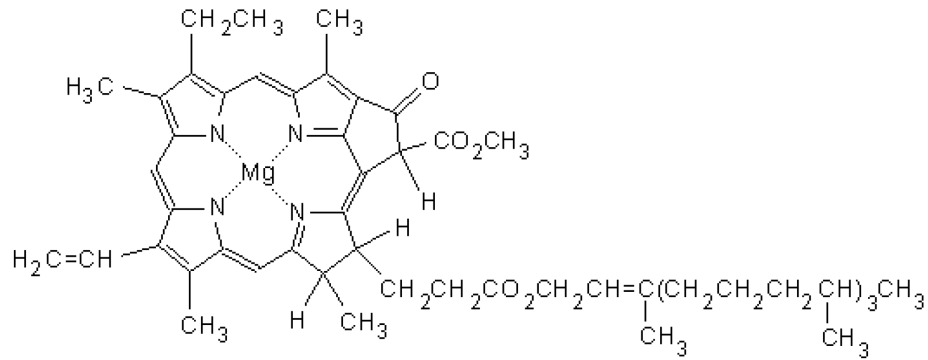


Abbildung 1.1: Molekularstruktur eines Chlorophyll (*a*) Moleküls. Ein Magnesium Ion bindet über eine Komplexverbindung an den vier Stickstoffatome der vier Pyrrole. Quelle: <http://www.food-info.net/uk/colour/chlorophyll.htm>

Chlorophylle sind sehr effektive Photorezeptoren¹⁰ ($\approx 100\%$ Photonenergieumsetzungsvermögen), weil sie ein Netz alternierender Einzel- und Doppelbindungen besitzen. Sie absorbieren besonders stark (der Absorptionskoeffizient ist einer der größten beobachteten an organischen Verbindungen) im sichtbaren Bereich des Spektrums, wo auch das Maximum der Sonnenstrahlung liegt, die die Erde erreicht. Das photosynthetische Reaktionszentrum (engl.: photosynthetic reaction center, RC) aus dem schwefelfreien Purpurbakteriums *Rhodobacter sphaeroides* ist eins der effizientesten und am meisten erforschten photosynthetischen Proteine mit einem Photonenumsetzungsvermögen von fast 100% ¹¹. Es ist genau diese Eigenschaft, die Wissenschaftler ausnutzen wollen, um einerseits effizientere und andererseits nachhaltige, umweltschonende Biosolarzellen zu konstruieren, die auf dem von der Natur entwickelten Mechanismus der Photosynthese basieren. Allerdings ist das RC ein Membranprotein, das in den Chromatophoren von photosynthetischen Bakterien eingebettet ist und seine Funktion dem Bakterium lebensnotwendige Energie zu schaffen ist intrinsisch und wurde über eine Zeitspanne von Tausenden von Jahren durch die Evolution fein abgestimmt. Um das RC als Basis für eine photovoltaische Zelle verwenden zu können, müssen mehrere experimentelle Schwierigkeiten überwunden werden, wie z.B. Stabilisierung des Proteins außerhalb seiner natürlichen Umgebung, definierte Orientierung des Proteins, sowie eine effiziente Schaltung der internen Elektronentransferreaktionen in einem externen anorganischen Elektrodensystem. Bis heute gab es zahlreiche Versuche vieler Forschungsgruppen solche Schaltkreise zu realisieren, unter anderem mittels Immobilisierung des Proteins

an Metaloberflächen¹² oder gelöst in flüssigen elektrochemischen Zellen¹³. Trotz vieler experimentellen Versuchen bleibt die Ausbeute des Photostroms gering.

2. Motivation

Ziel dieser Arbeit ist das photosynthetische Reaktionszentrum (RC) aus dem Bakterium *Rb. sphaeroides* in einem künstlichen Membransystem zu rekonstituieren und seine Aktivität bei Belichtung mittels oberflächenverstärkter Infrarot Absorptionsspektroskopie (engl.: Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy, SEIRAS) zu untersuchen. Dabei wird das Protein zunächst über einen sogenannten His-Tag Anker auf einer Goldoberfläche immobilisiert und anschließend in dem von unserer Gruppe entwickelten Protein-verankerten Lipid-Membran (engl.: protein-tethered Bilayer Lipid Membrane, ptBLM) System rekonstituiert, das erstmals auf das Protein Cytochrom *c* Oxidase (CcO) angewandt worden ist¹⁴. Die Vorteile dieses Systems liegen in der definierten Orientierung der auf der Metalloberfläche adsorbierten Proteine unter Beibehaltung ihrer natürlichen Umgebung, der Lipidmembran, was die Untersuchung der Proteine in ihrer funktional aktiven Form mittels oberflächenanalytischen und spektroskopischen Methoden ermöglicht.

Die Fourier-transformierte Infrarot-Spektroskopie (FTIR) eignet sich besonders gut zur Untersuchung der Lichtanregung des bakteriellen photosynthetischen Reaktionszentrum. Das RC ist bereits in Chromatophoren¹⁵ aus photosynthetischen Bakterien oder aufgereinigt und gelöst, meistens als rehydrierte dünne Schicht zwischen zwei CaF₂ Fenstern¹⁶ untersucht worden. Steady-state hell minus dunkel Differenzspektren oder Spektren bei kontinuierlicher Belichtung sind aufgenommen worden und Markerbanden der Hydrochinonbildung aus dem Chinon/Hydrochinon-Pool anwesend in den Chromatophoren bzw. zugegeben zu gelösten RCs sind identifiziert worden. In den meisten Untersuchungen sind die Proteine in Anwesenheit von Elektronendonatoren gemessen worden, um die oxidierte P870⁺-Einheit zu reduzieren^{15-16, 17}, bzw. bei Zugabe anderer künstlicher Redoxmediatoren^{15, 16b, 17}.

In dieser Arbeit wird eine andere Herangehensweise verwendet, wobei die SEIRA-Spektroskopie in der Abgeschwächten Totalreflexion (engl.: attenuated total internal reflexion, ATR) Konfiguration angewandt wird. Die Oberflächenverstärkung ist durch eine dünne nano-strukturierte Goldschicht auf dem ATR-Kristall gegeben, auf der die Proteine immobilisiert werden. Diese Methode ist bereits erfolgreich zur Untersuchung einiger Membranproteine verwendet worden, wie z.B. CcO^{14, 18} und Rhodopsin¹⁹. Aufgereinigte RC Proteine werden als Monoschicht auf der Goldoberfläche mittels der

His-Tag Technik (eine Technik, die auch für die Messung von Photoströmen verwendet wird^{12a, 20}) immobilisiert. Bei *in situ* Dialyse der Proteinmonoschicht in Anwesenheit von Lipidmicellen werden die Proteine in die ptBLM rekonstituiert. Als Vorteil von diesem System kann fettlösliches Coenzym Q₁₀ in die Lipidphase ko-rekonstituiert werden, während das Protein in seiner vollständig funktionalen Form erhalten bleibt. Markerbanden der Chinon Spezies können somit erkannt und zugeordnet werden.

Die Möglichkeiten dieser experimentellen Anordnung können erweitert werden, indem zwei Membranproteine gemeinsam ko-rekonstituiert werden, um ihre Interaktion zu untersuchen. In dieser Arbeit wird der *bc*₁-Komplex zusammen mit dem RC, beide aus *Rb. sphaeroides*, in die ptBLM ko-rekonstituiert. Es ist bereits gezeigt worden, dass der *bc*₁-Komplex mit dem RC beim gepulsten, lichtinduzierten Elektronentransport und bei elektrochromer Bandenverschiebung der Carotinoide in Chromatophoren aus *Rb. sphaeroides*²¹ interagiert. Weiters konnte der reversible Elektronentransfer innerhalb des *bc*₁-Komplex auf Grund des durch das RC erzeugten elektrischen Feldes gezeigt werden²². In dieser Arbeit wird die Interaktion beider Proteine über die Chinon/Hydrochinon Spezies erwartet, nachdem das RC durch Belichtung mit einer Quartz Halogenlampe angeregt wird.

3. Membranproteine

Proteine oder Eiweiße sind biologische Makromoleküle, die aus den 20 in der Natur vorkommenden Aminosäuren aufgebaut sind²³. Sie sind einer der Hauptbestandteile aller Zellen und verleihen ihnen nicht nur Struktur, sondern sind auch für deren funktionelle, metabolische Aktivität verantwortlich.

Eine besondere Klasse der Proteine bilden die sogenannten Membranproteine. Sie sind Proteine, die in die Lipidschicht einer Biomembran eingelagert bzw. dieser aufgelagert sind. Dabei kann es sich entweder um die äußere Zellmembran oder die Membran intrazellulärer Organellen handeln. Die Membranproteine können die Lipiddoppelschicht vollständig durchziehen und werden auch integrale bzw. Transmembranproteine genannt, oder nur einer Seite der Lipiddoppelschicht angelagert bzw. verankert sein und werden daher periphere bzw. membranständige Proteine genannt. Zusätzlich hängt die Struktur der Membranproteine von der Art ab, mit der sie mit der Membran assoziiert sind. Obwohl eine Biomembran hauptsächlich aus Lipidmolekülen aufgebaut ist, beträgt ihr Anteil an Membranproteinen 50 % (bei tierischen Zellen)²³, die eine entscheidende Rolle bei nahezu aller ihrer zellulären Funktionen spielen.

Die Transmembranproteine unterscheidet man funktionell, z.B. Transporter und Kanäle sind essentiell um u.A. das Gleichgewicht von Ionen zu gewährleisten, Enzyme katalysieren wichtige Stoffwechselprozesse, Rezeptoren bzw. Lichtrezeptoren dienen der Weiterleitung von Signalen bzw. Lichtabsorption in der Lipidschicht usw. Da die Transmembranproteine die Lipiddoppelschicht durchdringen, besitzen sie sowohl hydrophobe, die mit den Lipidmolekülen im Kontakt sind, als auch hydrophile Bereiche, die entweder intra- oder extrazellulär orientiert sind. Auf Grund dieses amphiphilen Charakters, ist ihre Struktur und somit auch ihre Funktion auf die Umgebung empfindlich. Deswegen sind Membranproteine besonders schwierig und aufwändig zu untersuchen. Daher sind bis dato nur sehr wenige Membranproteine vollständig charakterisiert und erforscht.

Die in dieser Arbeit vorkommenden Proteine sind Transmembranproteine, die Teil der sogenannten photosynthetischen Elektronentransportkette und in den Chromatophoren (invaginierte Teile der Zellmembran bei Bakterien) des schwefelfreien

photosynthetischen Purpurbakteriums *Rhodobacter sphaeroides* eingebettet sind. Das photosynthetische Reaktionszentrum ist ein Lichtrezeptor, während der bc_1 -Komplex ein Enzym ist.

3.1 Das photosynthetische Reaktionszentrum (RC)

Das Photosynthetische Reaktionszentrum (engl.: photosynthetic reaction center, RC) befindet sich in der Zellmembran von photosynthetischen Bakterien. Dort ist es für die Umsetzungsreaktion der Lichtenergie eines Photons in chemische Energie (in Form eines elektrochemischen Gradienten) verantwortlich. Es ist somit ein Teil der sogenannten Elektronentransportkette. Diese Kette ist ein Mechanismus der Zelle, bei dem mehrere elektronenübertragende Moleküle und Proteine (die auch Komplexe genannt werden) beim Transport von Elektronen von einem Donor zu einem oder mehreren Akzeptoren zusammenwirken (Abb. 3.1).

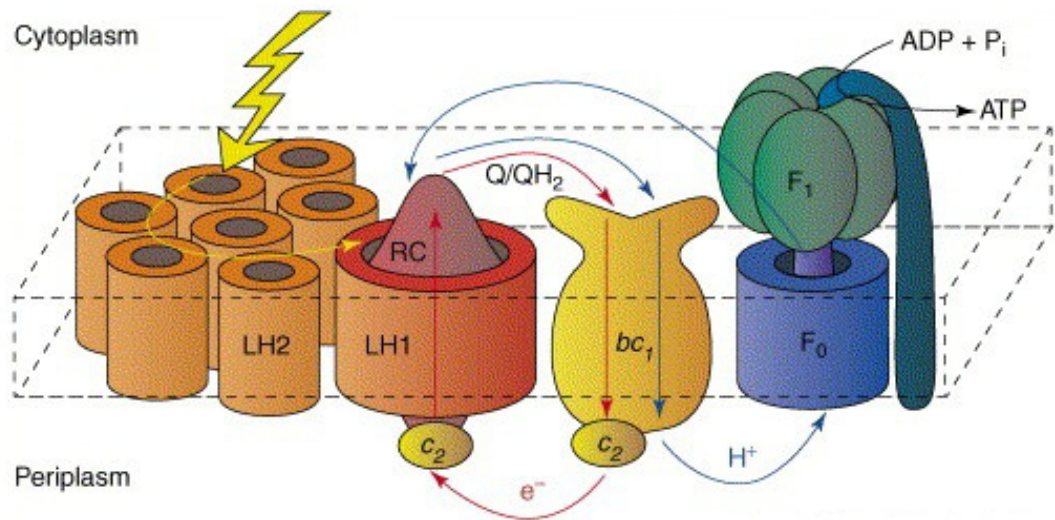


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der photosynthetischen Elektronentransportkette bei schwefelfreien Purpurbakterien und die daran beteiligten Proteinkomplexe. Nach der Lichtabsorption durch einen sogenannten Lichtsammelkomplex (LH2) und der Weiterleitung der Anregung über LH1 zum RC, wo die Ladungstrennung stattfindet (s. Elektronentransferreaktionen im RC) wird ein Elektron zum Chinon (Q) geleitet. Nach zwei turnovers wird das gebildete Hydrochinon (QH₂) durch das cyt c₂ oxidiert, eine Reaktion die vom bc₁-Komplex katalysiert wird (s. 3.2), wobei zwei H⁺ zum Periplasma transloziert werden. Der zyklische Elektronentransfer wird durch die Reduktion des photooxidierten RC durch cyt c₂ geschlossen. Der resultierende H⁺-Gradient wird von der F₁F₀-ATP-Synthase ausgenutzt um ATP aus ADP und einem nichtorganischen Phosphat zu synthetisieren. Die gelbe Linie stellt die Anregungsübertragung dar, die roten Linien den Elektronentransfer und die blauen Linien repräsentieren den Protonentransport. Die Membranebene ist durch die unterbrochene Linien gekennzeichnet. Der Kernkomplex aus LH1 und RC oder nur das RC alleine reicht für Lichtabsorption aus.

Quelle: ⁹

Gekoppelt an diesem Elektronentransport ist das Pumpen von Protonen (H⁺-Ionen) durch die Zellmembran. Der so entstandene elektrochemische Gradient wird ausgenutzt, um das Molekül Adenosintriphosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) zu synthetisieren. ATP ist die universelle Form unmittelbar verfügbarer Energie in jeder Zelle, die für die grundlegenden energieverbrauchenden Prozesse aller Lebewesen genutzt wird, z.B. Synthese von organischen Molekülen, aktiver Ionen- und Molekültransport durch die Membran, etc.²³.

Molekularstruktur

Die Struktur des RC ist bereits mit einer atomaren Auflösung von 1,87 Å bestimmt worden²⁴ und die Daten sind in der Proteindatenbank PDB.com (Code: 2uxl) zu finden. Die Dimensionen sind in Abbildung 3.2 zu sehen.

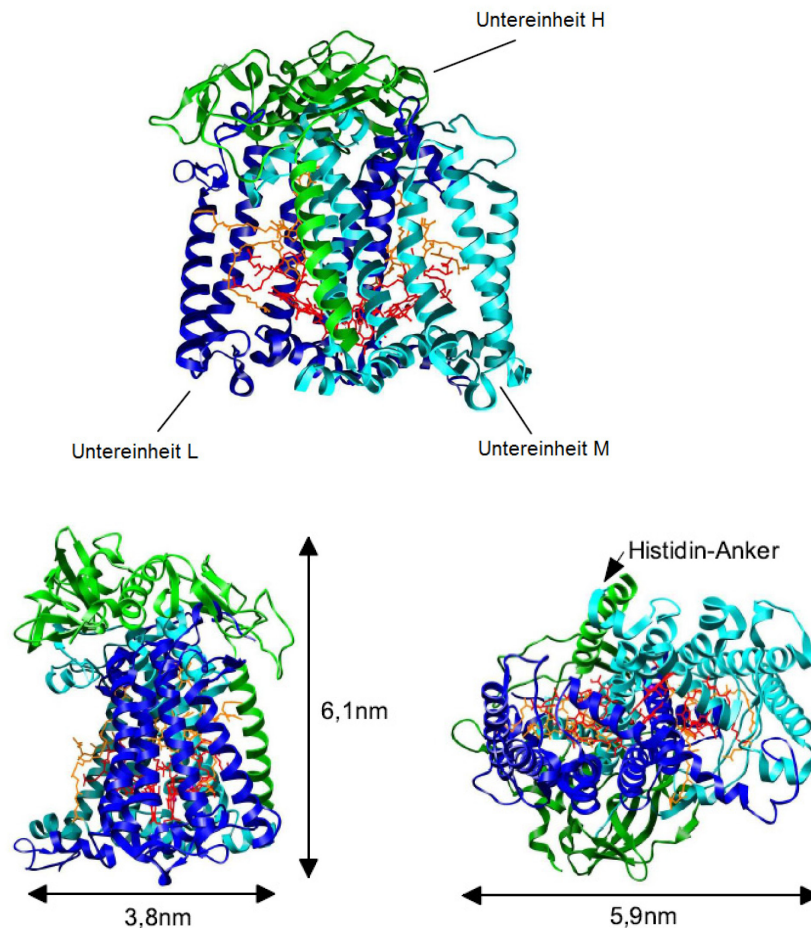


Abbildung 3.2: Das bakterielle photosynthetische Reaktionszentrum. Oben und unten links sind seitliche Ansichten aus der Membranebene. Unten rechts ist die Ansicht von der periplasmatischen Seite. Der Histidin-Anker (His-Tag) befindet sich am C-Terminus der M-Untereinheit.

Quelle: ³ (bearbeitet)

Das Proteinrückgrat besteht aus drei Polypeptidketten²⁵: der L-, M-, und H-Untereinheit. Die L- und die M-Untereinheit bilden den strukturellen und funktionellen Kern des RC. Die beiden homologen Untereinheiten bilden 5 transmembrane Helices, die symmetrisch zueinander angeordnet sind. Die H-Untereinheit bindet an diese 2 Untereinheiten, besitzt nur eine transmembrane Helix und liegt auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran.

In dieses Proteinrückgrat sind folgende prosthetische Gruppen bzw. Kofaktoren eingebettet (Abb. 3.3):

Ein Dimer aus 2 Bakteriochlorophyll (BChl) Molekülen, die in der Nähe der periplasmatischen Seite der Membran liegen. Dieses Dimer wird aufgrund seiner fundamentalen Rolle in der Photosynthese spezielles Paar genannt und absorbiert maximal bei 870 nm, d.h. im infraroten, nahe an der Grenze des sichtbaren Bereichs, weswegen es auch oft als die P870-Einheit in der Literatur bezeichnet wird.

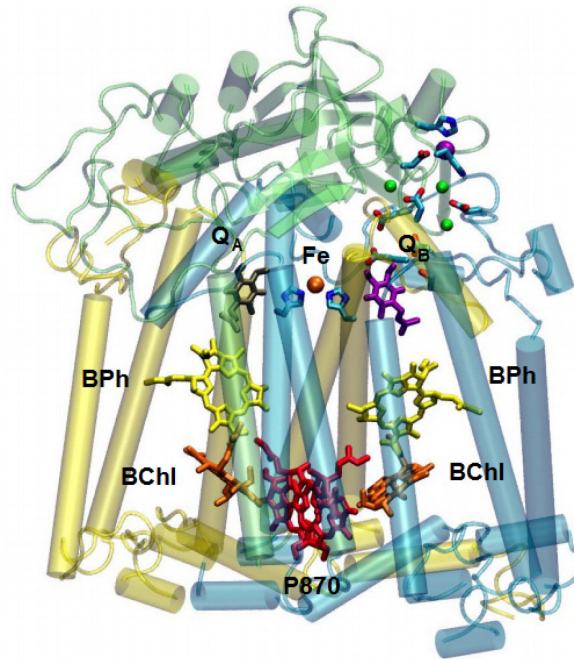


Abbildung 3.3: Kofaktoren des bakteriellen RC. Rot - P870-Einheit, orange - Bakteriochlorophyll (BChl), gelb – Bakteriopheophytin (BPh), grau - QA, violett - QB, braun - nicht-Häm Eisenion (s. Text)

Quelle: <http://mcb.illinois.edu/faculty/profile/cwraight> (bearbeitet)

Als nächstes gibt es zwei weitere BChl, zwei Bakteriopheophytine (BPh) (= BChl mit 2 H Atomen statt 2 Stickstoffatomen), zwei Ubichinon Q_{10} Moleküle, die in der Literatur als Chinon Q_A und Q_B bezeichnet werden, sowie ein nicht-Hämeisenion (Abb. 3.3). Das Chinon Q_A ist fest am Proteinrückgrat gebunden, während das Chinon Q_B weniger stark gebunden ist. Es kann das Protein verlassen und in die Lipidphase der Membran diffundieren.

Das in dieser Arbeit verwendete RC besitzt auch einen am C-Terminus der M-Untereinheit genetisch angebrachten Polyhistidin-Tag (His-Tag), über den das Protein an der Goldoberfläche immobilisiert werden kann (s. 7.D).

Elektronentransferreaktionen im RC

Die Reaktion beginnt mit der Absorption eines Lichtquants durch das spezielle Paar P870²⁵. Diese Anregung des Dimers führt zu einem schnellen Transfer eines Elektrons von dieser Stelle über ein weiteres Bacteriochlorophyll (BChl) zum Bacteriopheophytin (BPh) in der L-Untereinheit (Abb. 3.4).

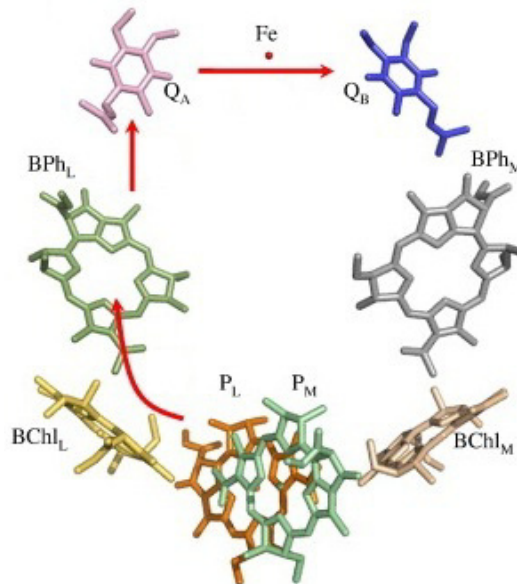


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Ladungstrennung und des Elektronenweges innerhalb des RC. Die rote Pfeile bezeichnen die einzelne Schritte des Elektronentransfers

Quelle: ⁶ (bearbeitet)

Diese Reaktion, die eine Ladungstrennung induziert, wobei das spezielle Paar P870⁺ positiv und das BPh⁻ negativ geladen werden, erfolgt im picosekunden Bereich (10⁻¹² s)²⁵. Interessanterweise nehmen nur die Kofaktoren der L-Untereinheit an dieser Reaktion teil, obwohl die L- und M-Untereinheit ein fast symmetrisches Dimer bilden. In diesem hochenergetischen Zustand könnten P870⁺ und BPh⁻ eine Ladungsrekombination eingehen, d.h. das Elektron beim BPh⁻ würde zurück zum speziellen Paar kehren und es neutralisieren. So eine Reaktion würde die durch Lichtabsorption gewonnene Energie dieses Elektrons verschwenden und sie einfach in Wärme umwandeln. Die Ladungsrekombination wird folgendermaßen unterdrückt: Einerseits liegt ein Elektron-Akzeptor, das Chinon Q_A, auf weniger als 10 Å Entfernung vom BPh-, von dem das Elektron schnell übernommen und noch weiter vom speziellen Paar entfernt wird. Andererseits befindet sich auf der periplasmatischen Seite ein

reduziertes Cytochrom *c* auch auf einer Entfernung $< 10 \text{ \AA}$ in der Nähe vom speziellen Paar, das die positive Ladung des P870^+ durch Übergabe eines Elektrons neutralisiert und es für eine weitere Lichtabsorption bereitstellt¹⁰. Außerdem sind einige der späteren Rekombinationsreaktionen besonders langsam (zeitliche Konstanten solcher Reaktionen sind in Abb. 3.5 dargestellt) und somit ist die Richtung des Elektronentransfers thermodynamisch begünstigt².

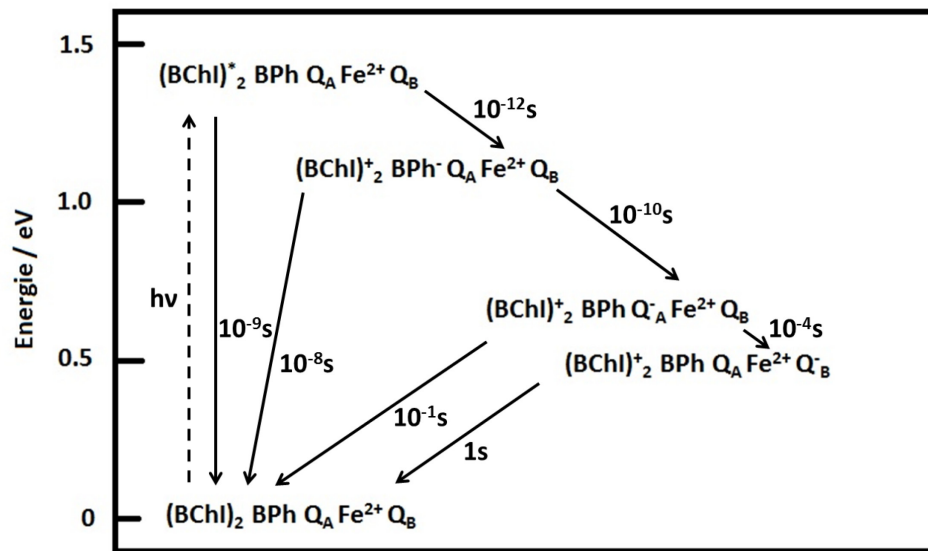


Abbildung 3.5: Zeitliche Konstanten der Elektrontransfer- sowie die zugehörige Rekombinationsreaktionen im bakteriellen RC.

Quelle: ²

Zum Schluss reduziert das Elektron das zweite Chinon Q_B , welches noch ein zweites, durch eine nachfolgende Lichtquantabsorption angeregtes Elektron aufnehmen kann (Abb. 3.6). Diese zweifache Reduktion des Q_B führt zur Aufnahme von zwei Protonen (H^+ -Ionen) aus dem Zytoplasma (was zur Entstehung eines Protongradienten über die Membran beiträgt). Die so entstandene, vollständig reduzierte Form des Chinons, das Hydrochinon QH_2 kann nun in die Lipidphase der Membran diffundieren und Teil des sogenannten Chinon-Pools werden, um weitere Komplexe aus der Elektronentransportkette zu reduzieren.

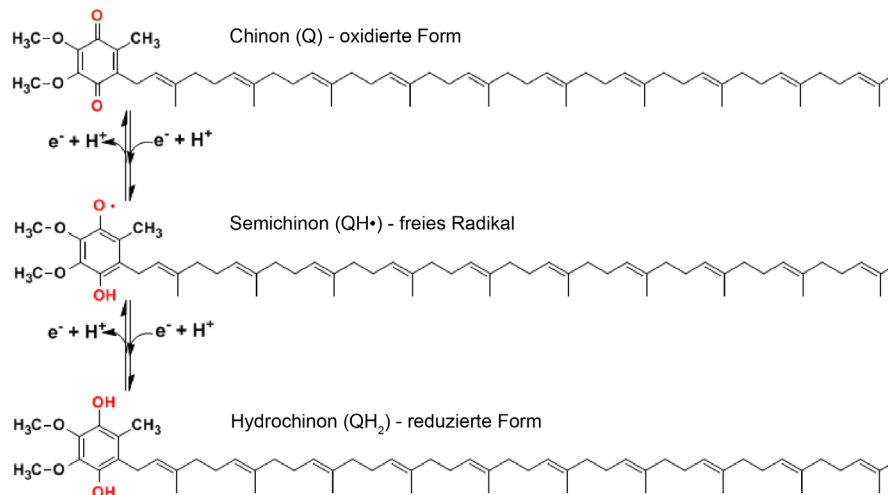


Abbildung 3.6: Verschiedene Formen des Coenzym Q₁₀. Bei Aufnahme eines Elektrons wird das Chinon zunächst zum Semichinon reduziert. Dieses kann noch ein zweites Elektron aufnehmen und wird zum Hydrochinon vollständig reduziert.

Quelle: http://www.biosite.dk/leksikon/ubiquinon_uk.htm (bearbeitet)

3.2 Die Coenzym Q : Cytochrom *c* Oxidoreduktase (*bc*₁-Komplex)

Die Coenzym Q : Cytochrom *c* Oxidoreduktase, oder auch Cytochrom-*c*-Reduktase, Komplex III oder häufig in der Literatur *bc*₁-Komplex genannt ist ein Membranprotein, das sowohl Teil der photosynthetischen Elektronentransportkette, als auch der mitochondrialen Atmungskette ist. So wie alle Enzyme bekommt dieses Protein seinen Namen nach seiner Funktion: Es fungiert als Oxidoreduktase, wobei es die Oxidation des Chinons Coenzym Q₁₀ (oder genauer seiner reduzierten Form Hydrochinon) gekoppelt an die Reduktion von Cytochrom *c* katalysiert. Bei dieser Reaktion werden auch 4 Protonen aus dem Zytoplasma zum Periplasma transloziert.

Der bc_1 -Komplex ist ein transmembraner Proteinkomplex, der unter physiologischen Bedingungen als Dimer auftritt und aus insgesamt elf Untereinheiten besteht. Der funktionelle Komplex besteht aber aus nur drei essentiellen katalytischen Untereinheiten mit vier Kofaktoren (Abb. 3.7):

- Cytochrom b mit zwei Häm b Molekülen (b_L engl.: L für Low potential und b_H engl.: H für High potential)
- Cytochrom c_1 mit einem Häm c Molekül
- Rieske Eisen-Schwefel-Protein (IPS, engl.: iron sulfur protein) mit einem $[2Fe\cdot 2S]$ -Zentrum

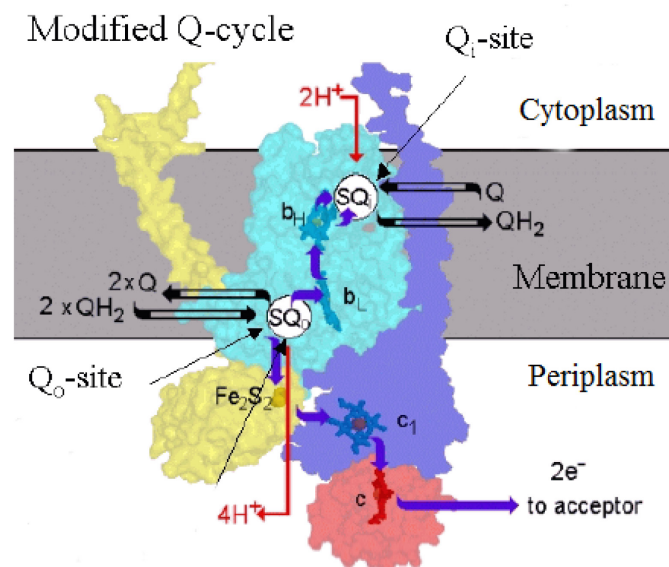


Abbildung 3.7: Struktur der funktionellen Einheit des bc_1 -Komplex. Blau – Cytochrom b , violett – Cytochrom c_1 , gelb – Rieske Zentrum, rot – Cytochrom c

Quelle: http://www.life.illinois.edu/crofts/bioph354/bc-complex_summary.html (bearbeitet)

Da das Protein ein Cytochrom b und c_1 besitzt, trägt es den Namen bc_1 -Komplex.

Der in dieser Arbeit verwendete bc_1 -Komplex besitzt zusätzlich einen His-Tag am C-Terminus der Cytochrom b -Untereinheit über den er auf der Goldoberfläche immobilisiert werden kann (s. 7.D).

Der Q-Zyklus

Der Q-Zyklus wurde zum ersten Mal von Peter Mitchell im Jahr 1975 vorgestellt²⁶ und bezeichnet eine Folge von Redoxreaktionen unter der Beteiligung von Chinon (Q, engl.: Quinone) bzw. Hydrochinon (QH_2) und Cytochrom *c* bzw. einen Mechanismus der Elektronenübertragung gekoppelt an den Protonentransport am bc_1 -Komplex.

Das Chinon dient als Elektronenüberträger zwischen dem RC und dem bc_1 -Komplex. Es wird vom RC unter Aufnahme von zwei Elektronen (die von der Lichtabsorption stammen) und zwei Protonen aus dem Zytoplasma zu Hydrochinon reduziert (s. 3.1). Das Hydrochinon kann in der Membran zum bc_1 -Komplex diffundieren und seine aufgenommene Elektronen dort abgeben. Sowohl das Chinon, als auch das Hydrochinon sind lipophile Moleküle (Abb. 3.6) und können sich ausschließlich nur in der Lipidphase der Membran bewegen und bilden dort einen sogenannten Chinon/Hydrochinon Pool.

Der bc_1 -Komplex besitzt 2 Bindungsstellen für Chinon/Hydrochinon Spezies, die Q_o oder Q_p -Zentrum (o für engl.: output, bzw. P für engl.: positive side) und Q_i oder Q_N (i für engl.: input, bzw. N für engl.: negative side) genannt werden (Abb. 3.8). An der Q_o -Bindungsstelle kann ein Hydrochinonmolekül binden und wird dort oxidiert, wobei an der Q_i -Bindungsstelle ein Chinonmolekül binden kann, um dort reduziert zu werden.

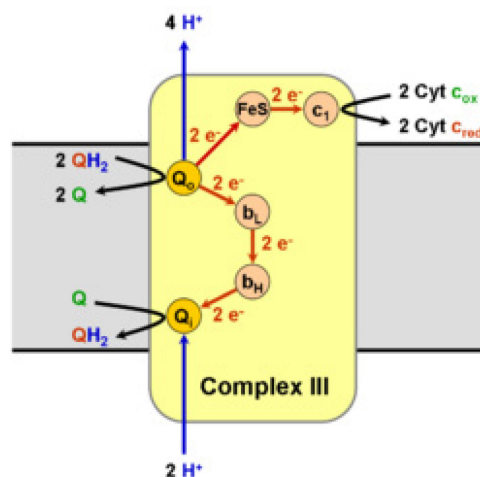


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung des Q-Zyklus im bc_1 -Komplex

Quelle: http://en.wikipedia.org/wiki/Coenzyme_Q_%E2%80%93_cytochrome_c_reductase
(bearbeitet)

Wenn ein Hydrochinonmolekül aus der Lipidphase an der Q_o -Stelle bindet, findet eine Bifurkation der zwei Elektronen statt. Einerseits wird ein Elektron über das Eisen-Schwefel Zentrum des Rieske-Proteins und das Häm c_1 Molekül zum angebundenen Cytochrom c geleitet. Das so reduzierte Cytochrom c kann weiters die positiv geladene P-Einheit des RC reduzieren um eine darauffolgende Lichtabsorption zu ermöglichen (s. 3.1 und Abb. 3.8).

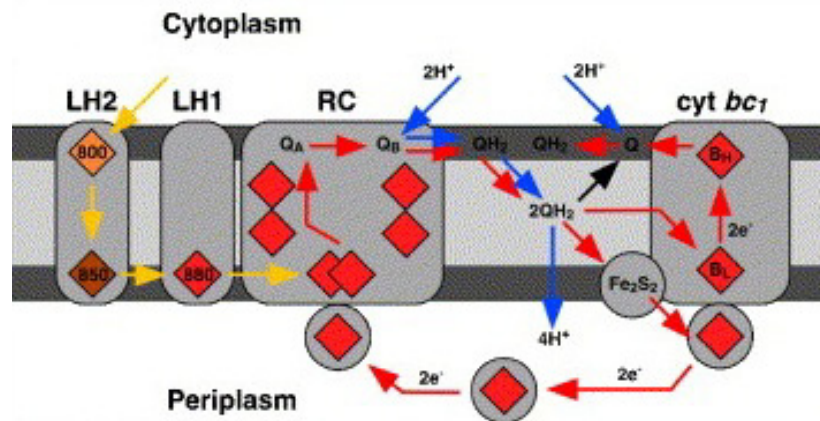


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der relativen Orientierung der Proteine, sowie die photo-induzierte zyklische Elektronentransportkette bei photosynthetischen Purpurbakterien. Die gelben Pfeile repräsentieren die Lichtanregungsübertragung, die roten den Elektronen- und die blauen den Protonentransport.

Quelle: ⁸ (bearbeitet)

Da das Cytochrom c nur ein Elektron aufnehmen kann, wird QH_2 zunächst nur zum freien Radikal Semichinon ($QH\bullet$) an der Q_o -Stelle oxidiert (Abb. 3.6). Als freies Radikal ist es aber instabil und gibt das zweite Elektron über das Häm b_L und b_H an ein weiteres Chinonmolekül weiter. Das so entstandene Chinon an der Q_o -Stelle gibt nun seine zwei Protonen an das Periplasma ab und kann so, in seiner oxidierten Form, die Bindungsstelle verlassen und wieder in die Lipidphase der Membran diffundieren. Dieser Halbzyklus wird nun ein zweites Mal durchlaufen.

Andererseits bindet an der Q_i -Stelle ein Chinon und wird über Häm b_L und b_H zuerst zum Semichinon reduziert. Dieses nimmt dann ein zweites Elektron über Häm b_L und b_H sowie zwei Protonen aus dem Zytoplasma auf und kann als vollständig reduziertes Hydrochinon die Q_i -Bindungsstelle verlassen und durch ein weiteres oxidiertes Chinon ersetzt werden.

In Summe werden bei einem vollständigen Q-Zyklus zwei Hydrochinone an der Q_o -Stelle zum Chinon oxidiert und andererseits wird an der Q_i -Stelle ein Hydrochinon zurückgewonnen, wobei zwei Cytochrom *c* reduziert werden (Abb. 3.8). Gekoppelt an diese Reaktionen werden zwei Protonen dem Zytoplasma entzogen und vier Protonen dem Periplasma abgegeben, was zur Ausbildung des Protonengradienten über die Membran führt.

3.3 Die Protein-verankerte Lipid-Membran (ptBLM)

Das photosynthetische Reaktionszentrum und der *bc_L*-Komplex sind Membranproteine. Sie sind unter physiologischen Bedingungen in die Lipiddoppelschichtmembran der Zelle i.e. die Chromatophoren des Bakteriums (bei Pflanzen sind sie in der Thylakoidmembran der Chloroplasten) eingebettet.

Um die Funktionalität bzw. Aktivität eines solchen Proteins zu untersuchen, ist es erwünscht, die möglichst physiologischen Bedingungen in einem gut definierten System zu rekonstruieren, da das Protein sonst leicht denaturiert. Dafür bietet sich die von unserer Gruppe entwickelte Methode der Protein-Immobilisierung an: Die Protein-verankerte Lipid-Membran (engl.: protein-tethered Bilayer Lipid Membrane - ptBLM)¹⁴ (Abb. 3.9).

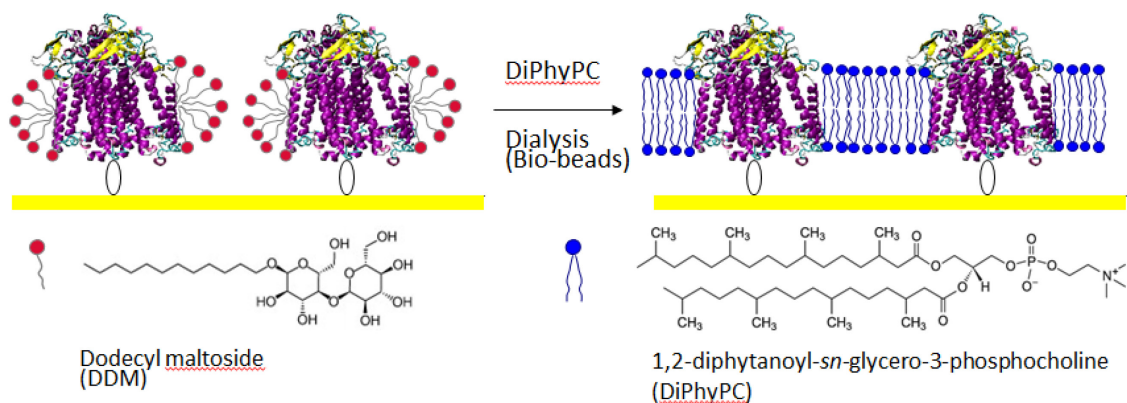


Abbildung 3.9: Rekonstitution des Proteins in die ptBLM. Das mittels Detergensmolekülen (DDM) gelöste Membranprotein wird über den His-Tag auf der Goldoberfläche immobilisiert und anschließend in die ptBLM rekonstituiert durch Austausch der Detergens- mit Lipidmolekülen.

Mit dieser Methode können Membranproteine funktionell in eine künstliche Membran rekonstituiert werden. Ausgangspunkt bei dieser Methode ist die Möglichkeit, das Protein durch eine Ankergruppe auf einer Oberfläche zu immobilisieren. In dieser Arbeit wurden RC und *bc_L*-Komplex Proteine verwendet, die mit einem Histidin-Anker (engl.: His-Tag) versehen worden sind. Da solche Histidin-Anker eine starke und spezifische Affinität zu Ni^{2+} -Komplexen zeigen, wird die Immobilisierung auf einer Oberflächenschicht mit terminalen Ni^{2+} -Komplexen durchgeführt (s. 7.A.3). Die so aufbereitete Protein-Schicht wird danach mittels Dialyse in eine Lipid-Membran rekonstituiert, wobei Protein-gebundene Detergens-Moleküle durch Lipid-Moleküle ausgetauscht werden (s. 7.A.3).

Das ptBLM-System, das in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde ist in Abb. 3.10 dargestellt. Das RC besitzt den His-Tag am C-Terminus der M-Untereinheit und ist somit mit dem speziellen Paar P in Richtung Goldoberfläche orientiert. Der bc_1 -Komplex besitzt den His-Tag am C-Terminus der Cytochrom b -Untereinheit. Somit befindet sich die Cytochrom c (Cyt c) Bindungsstelle auf der äußeren Membranseite. Dies bedeutet, dass die relative Orientierung der beiden Proteine (die P-Einheit des RC und die Cyt c Bindungsstelle des bc_1 -Komplex liegen auf der gegenüberliegenden Seite der Membran) verschieden ist als in den natürlichen Chromatophoren des Bakteriums (wo die P-Einheit und die Cyt c Bindungsstelle beide auf der periplasmatischen Seite liegen, s. Abb. 3.8). Somit kann ein Cyt c Molekül, das vom bc_1 -Komplex reduziert wird, die Membran nicht durchdringen und die oxidierte P^+ -Einheit reduzieren.

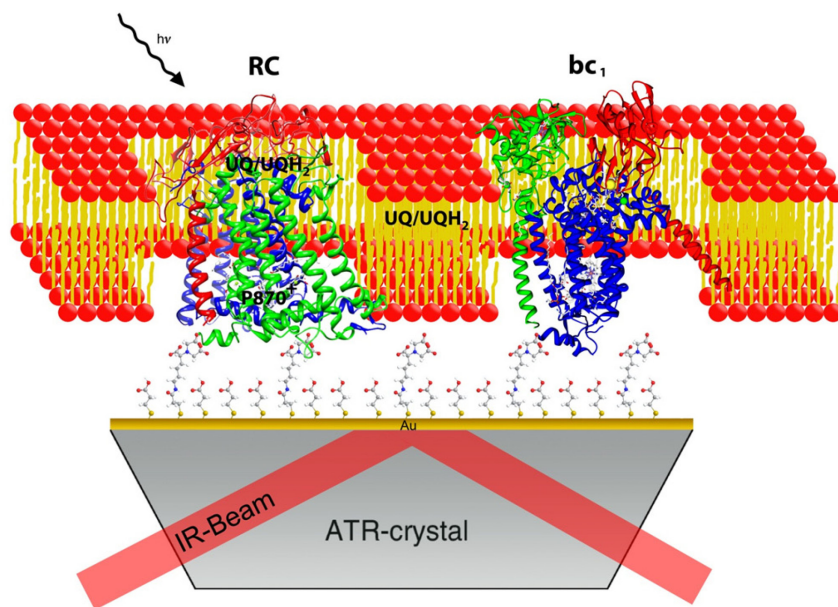


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten ptBLM-Systems. Die Proteine werden auf der mit dem two-layer gold funktionalisierten Fläche eines Silicium ATR-Kristalls (s. 7.A.3) immobilisiert und in die ptBLM ko-rekonstituiert.

4. Theoretische Grundlagen und Messmethoden

4.1 Infrarotspektroskopie

Das gesamte elektromagnetische Spektrum kann auf Grund der Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Materie in mehrere spektroskopische Bereiche unterteilt werden. Das beruht auf der Tatsache, dass die Bausteine der Materie: Elementarteilchen, Atome, Moleküle verschiedene Anregungszustände besitzen, z.B. Spin, Rotation, Schwingungen etc²⁷. Bei Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Materie können diese Anregungszustände, in Abhängigkeit von der Energie der einfallenden Strahlung, angeregt werden und somit können Übergänge zwischen unterschiedlichen Energiezuständen verursacht werden. Da diese Übergänge in der Materie äußerst Energie-spezifisch sind, lässt sich dies makroskopisch als Absorption/Emission bestimmter Wellenlängen der einfallenden Strahlung beobachten, was letztendlich durch ausführliche Analyse zu detaillierten Informationen über die zu untersuchende Materie führen kann.

Die Energie von Molekülschwingungen liegt im Energiebereich der Infrarotstrahlung. Das impliziert, dass Infrarotlicht ausgenutzt werden kann um verschiedene Schwingungsmoden von Molekülen anzuregen. Deswegen wird die Infrarotspektroskopie Schwingungs- oder auch Vibrationsspektroskopie genannt. Die Schwingungsmoden bzw. Schwingungsenergiezustände sind außer von der Art und Masse der Atome, aus denen das Molekül besteht, auch von der Art der Bindung, sowie der geometrischen Anordnung (Bindungswinkel) der Atome im Molekül abhängig, weswegen die Infrarotspektroskopie einen Vorteil im Vergleich zu anderen Spektroskopien, z.B. die Massenspektroskopie aufweist und sie zu einer hochspezifischen, analytischen Technik macht²⁸.

Mehratomige Moleküle können zu vielen unterschiedlichen Schwingungen, die unterschiedliche Energien besitzen, angeregt werden. So besitzt ein Molekül mit N Atomen $3N-6$ Schwingungsfreiheitsgrade, wenn man die Translations- und Rotationsfreiheitsgrade des gesamten Moleküls abzieht, d.h. der Schwerpunkt des Moleküls bleibt erhalten und man berücksichtigt nur die Schwingungen der Atome um ihre Gleichgewichtslage²⁷. Ausnahme hier ist ein lineares Molekül, das $3N-5$

Freiheitsgrade besitzt. Diese Schwingungen werden Normal- oder Grundschiebungen genannt. Bei großen Molekülen ist es unmöglich, alle Normalschwingungen zuzuordnen. Allerdings, besitzen viele Funktionelle Gruppen charakteristische Schwingungen, die weitgehend unabhängig vom Rest des Moleküls schwingen. Diese Schwingungen werden Gruppenschwingungen genannt. In Abb. 4.1 ist das an Beispiel der Methylgruppe (CH_3) dargestellt.

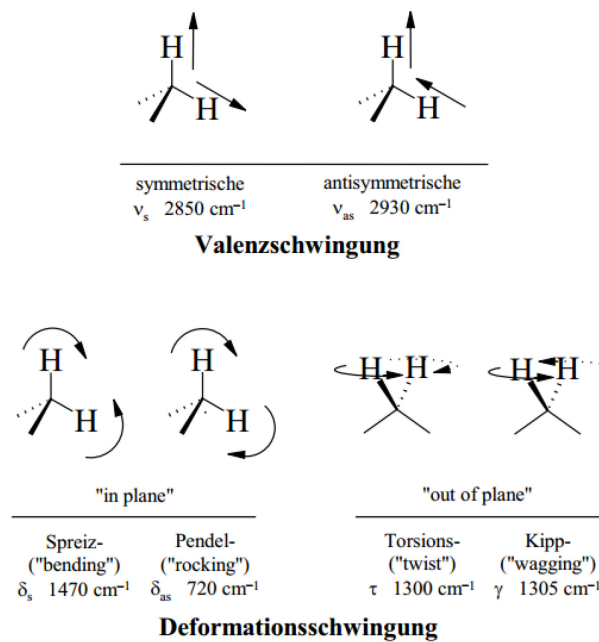


Abbildung 4.1: Schwingungen der Methylgruppe (CH_3)

Quelle: ¹

Nicht alle theoretisch möglichen Schwingungszustände können mittels Infrarotspektroskopie angeregt werden. Damit ein Übergang von einem Schwingungszustand zu einem höheren Schwingungszustand stattfinden kann, muss eine weitere Bedingung erfüllt werden, nämlich, das Molekül muss ein sich änderndes Dipolmoment besitzen. Klassisch betrachtet, muss die Schwingung ein oszillierendes elektrisches Feld erzeugen, welches mit dem oszillierenden elektrischen Feld der einfallenden elektromagnetischen Welle wechselwirken kann.

Das Dipolmoment $\vec{\mu}$ ist definiert als

$$\vec{\mu} = q \cdot \vec{l} \quad (4.1)$$

und charakterisiert somit eine räumliche Ladungstrennung. Je größer die Ladung q und je größer der Abstand $|\vec{l}|$ zwischen den Ladungen, desto größer ist das Dipolmoment. Dann ist für eine bestimmte Schwingung die Bedingung durch

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} \neq 0 \quad (4.2)$$

gegeben, damit sie Infrarotstrahlung absorbieren kann. Bei Molekülschwingungen kommt es zur Bewegung der einzelnen Atome und somit zur Änderung des Abstandes $|\vec{l}|$ zwischen den Atomen. Besitzen die Atome zusätzlich partielle Ladungen, auf Grund ihrer unterschiedlichen Elektronegativität, so verursachen diese Bewegungen eine Änderung des Dipolmoments des gesamten Moleküls²⁷.

In der Infrarotspektroskopie werden, aus historischen Gründen, die Positionen der absorbierten Wellenlängen in der Größe Wellenzahl aufgezeichnet. Die Wellenzahl ist definiert als der Kehrwert der Wellenlänge

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{n}{l} \quad (4.3)$$

und hat die SI-Einheit m^{-1} , es wird aber meistens die CGS-Einheit cm^{-1} verwendet. Somit gibt die Wellenzahl die Anzahl von Schwingungen bzw. Wellenlängen n pro Längen-Einheit l (Zentimeter) an. Die Wellenzahl ist direkt proportional zur Energie E und Frequenz ν und hängt über

$$E = hc\tilde{\nu} \quad \text{und} \quad \tilde{\nu} = \frac{\nu}{c} \quad (4.4)$$

mit diesen Größen zusammen. Hier ist h das Plancksche Wirkungsquantum und c die Lichtgeschwindigkeit.

Die Infrarotstrahlung umfasst den Wellenlängenbereich von 1 mm bis 800 nm, der sich an den sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums anschließt. In dieser Arbeit wird IR-Strahlung aus dem mittleren IR-Bereich ($25 \mu\text{m}$ - $2,5 \mu\text{m}$, bzw. $\tilde{\nu} = 400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) verwendet, was für die Strukturaufklärung von organischen Molekülen relevant ist⁴.

Bei spektroskopischen Untersuchungen wird die Schwächung der Strahlungsintensität in Abhängigkeit von der Wellenlänge beim Durchgang durch eine absorbierende Substanz analysiert. Bezeichnet man die frequenzabhängige Strahlungsintensität (auch

Einkanalspektrum genannt) vor und nach dem Durchdringen einer Probe mit $I_0(\nu)$ bzw. mit $I(\nu)$, dann ergibt sich für die Transmission $T(\nu)$ der Probe:

$$T(\nu) = \frac{I(\nu)}{I_0(\nu)} \quad (4.5)$$

Wird die Transmission in Abhängigkeit der Frequenz aufgetragen, erhält man ein Transmissionsspektrum. Diese Darstellung wird meistens für eine qualitative Beschreibung von Spektren verwendet. Häufig wird anstelle der Transmission die frequenzabhängige Extinktion, auch Absorbanz genannt, A berechnet, die angibt wie viel Strahlungsintensität von der Probe absorbiert wird.

$$T(\nu) = \frac{I(\nu)}{I_0(\nu)} = 10^{-\varepsilon(\nu) \cdot c \cdot d} = 10^{-A(\nu)} \quad \text{mit} \quad A(\nu) = \varepsilon(\nu) \cdot c \cdot d \quad (4.6)$$

wobei $\varepsilon(\nu)$ der dekadische molare Extinktionskoeffizient, c die Konzentration der Probe in mol/l und d die Schichtdicke der Probe in cm ist. Dieser Zusammenhang ist als Lambert-Beer Gesetz bekannt und zeigt den linearen Zusammenhang zwischen Absorbanz und Probenkonzentration bzw. Probendicke. Damit lässt sich das Absorptionsspektrum $A(\nu)$ darstellen, was bei quantitativen Auswertungen von größerer Bedeutung ist²⁹.

4.1.1 ATR-FTIR Spektroskopie

Die Abkürzung ATR-FTIR Spektroskopie steht für Abgeschwächte Totalreflexion (engl. attenuated total reflectance, ATR) - Fouriertransformierte Infrarot (FTIR) Spektroskopie und bezeichnet eine bestimmte Methode in der Infrarotspektroskopie.

Während beim Aufbau von dispersiven Spektrometern ein Gitter oder ein Prisma als Monochromator dient, wird in FTIR-Spektrometern stattdessen ein Michelson-Interferometer verwendet, was eine gleichzeitige Messung aller Wellenlängen des IR-Bereichs ermöglicht. Dies bringt einige Vorteile im Vergleich zu den dispersiven Spektrometern, wie z.B. Verkürzung der Messzeit und bessere Ausbeute der Intensität der IR-Quelle, was zu einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) führt, sowie eine bessere spektrale Auflösung. In Abb. 4.2 ist eine schematische Darstellung eines Michelson-Interferometers zu sehen.

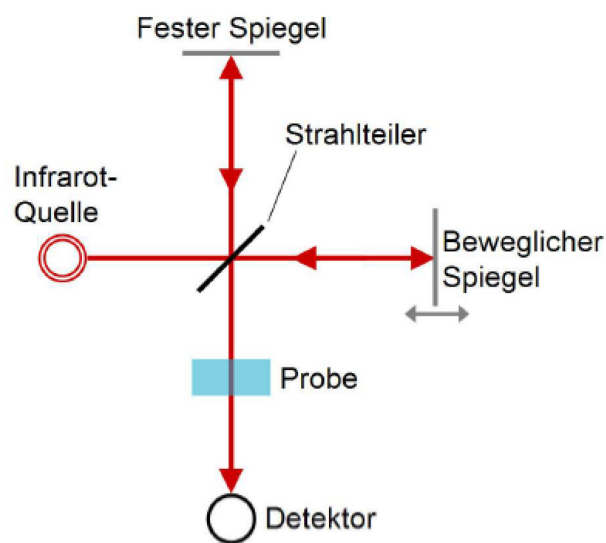


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung eines Michelson-Interferometers.

Quelle: ³

Die IR-Strahlung, die aus einer IR-Strahlungsquelle kommt, wird von einem halbdurchlässigen Strahlteiler in zwei Strahlen geteilt, die jeweils an Spiegeln reflektiert werden und wieder auf den Strahlteiler treffen, wo sie interferieren. Der Unterschied zwischen diesem Interferometer und einem Michelson-Interferometer liegt lediglich darin, dass einer der beiden Spiegel beweglich ist. Die Änderung der Position dieses

Spiegels bewirkt einen optischen Weglängenunterschied und somit auch eine zeitliche Verschiebung eines der beiden Teilstrahlen (aus diesem Grund auch Retardierung genannt). Nach dem Interferieren wird die Strahlung durch eine Probe und schließlich zum Detektor geleitet, wo die Intensität gemessen wird. Die Nulllage des beweglichen Spiegels wird definiert als die Position, wo beide Spiegel gleich weit entfernt von dem Strahlteiler sind. Der bewegliche Spiegel wird links und rechts von der Nulllage gefahren, sodass die Intensität des Gesamtstrahls durch die Probe immer variiert. Die Aufnahme, während der der bewegliche Spiegel in eine Richtung gefahren wird, wird auch ein scan genannt²⁷.

Die Aufzeichnung der gemessenen Intensität in Abhängigkeit von der Retardierung δ (das zweifache der Verschiebung des Spiegels von der Nulllage) wird Interferogramm genannt und enthält die gesamte Information über die Absorption von der Probe. (Abb. 4.3)

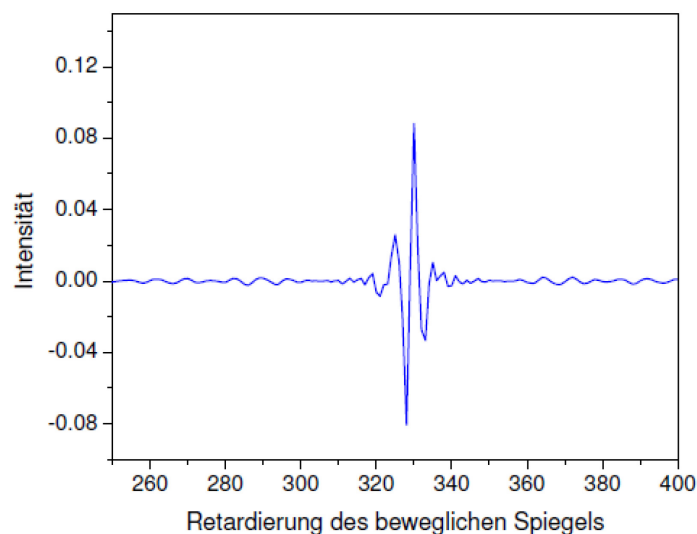


Abbildung 4.3: Interferogramm eines FTIR-Spektrometers

Quelle: ⁴

Bei Null, d.h. bei gleicher Entfernung der beiden Spiegel vom Strahlteiler, interferieren alle Wellenlängen konstruktiv. Deswegen ist die Intensität, die vom Detektor gemessen wird, an dieser Stelle maximal und wird auch „center burst“ genannt. Links und rechts von der Nulllage misst der Detektor eine komplizierte Überlagerung von interferierenden Wellenlängen. Weiter weg von der Nulllage kompensieren sich die Interferenzen der einzelnen Wellenlängen zu Null und es ist nur ein kleines Rauschen im Interferogramm zu sehen.

Die Retardierung stellt eine Ortsinformation dar, die mit Hilfe der Fouriertransformation in eine Energieinformation (Frequenz, Wellenzahl) transformiert wird. So erhält man die Intensitätsverteilung der IR-Strahlung in Abhängigkeit von der Wellenzahl, bzw. das Spektrum. Für den ortsabhängigen Term der gemessenen Intensität ergibt sich³⁰

$$I(\delta) = \int_0^{+\infty} B(\tilde{\nu}) \cos 2\pi\tilde{\nu}\delta \cdot d\tilde{\nu} \quad (4.7)$$

wobei über alle Wellenlängen integriert wird. Hier steht der Faktor $B(\tilde{\nu})$ für

$$B(\tilde{\nu}) = \frac{H(\tilde{\nu}) \cdot I(\tilde{\nu})}{2} \quad (4.8)$$

$I(\tilde{\nu})$ ist die Intensität der Strahlung bei einer bestimmten Wellenzahl und $H(\tilde{\nu})$ ist ein geräteabhängiger Faktor, auf Grund dessen die gemessene Intensität von der theoretisch zu erwartenden symmetrischen Form um die Nulllage abweicht. Er fasst die Eigenschaften des Strahlteilers, der Spiegel, des Detektors und der elektronischen Filter zusammen. Mathematisch stellt Gleichung 4.7 eine Fourierreihe mit reinen Cosinustermen und den Fourierkoeffizienten $B(\tilde{\nu})$ (=Spektrum), die sich mit

$$B(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) \cos 2\pi\tilde{\nu}\delta \cdot d\delta \quad (4.9)$$

berechnen lassen.

Schließlich wird die Absorbanz berechnet als (s. Gl. 4.6):

$$A(\tilde{\nu}, t) = -\log \frac{I_S(\tilde{\nu}, t)}{I_R(\tilde{\nu})} \quad (4.10)$$

wobei $I_S(\tilde{\nu}, t)$ (S für engl.: sample) die gemessene Intensität nach Durchgang durch die Probe ist und $I_R(\tilde{\nu})$ die Referenz-Intensität ist. Die Referenz-Intensität kann entweder ohne Probe gemessen werden, oder mit Probe, bei der eine zeitliche Veränderung von Interesse ist, wie z.B. die Anbindung einer Proteinschicht oder Konformationsänderung eines Moleküls nach Belichtung. Dann wird $I_S(\tilde{\nu}, t)$ zu einem späteren Zeitpunkt gemessen, daher auch die Zeitabhängigkeit in $A(\tilde{\nu}, t)$ und $I_S(\tilde{\nu}, t)$. Somit bekommt man sogenannte Differenzspektren, die auch in dieser Arbeit gezeigt und analysiert werden.

Abgeschwächte Totalreflexion (ATR)

Die FTIR-Spektroskopie kann in mehreren experimentellen Konfigurationen ausgeführt werden. Neben der Transmissionsspektroskopie hat sich die ATR-Konfiguration, erstmals eingeführt von Harrick (1960)³¹ und Fahrenfort (1961)³², heutzutage zu einer Standardprobentechnik in der Infrarotspektroskopie etabliert und wurde auch in dieser Arbeit verwendet. Sie basiert auf der Existenz einer evaneszenten Welle, die bei der Totalreflexion einer elektromagnetischen Welle zustandekommt und eignet sich besonders gut zur Untersuchung von Oberflächen und sehr dünnen Probeschichten. Die experimentelle Vorteile dieser Methode liegen in ihrer non-invasiven Natur, geringerer apparativen Ausstattung, sowie einfacher Probenzubereitung und Messaufwand.

Beim Übergang einer elektromagnetischen Welle aus einem optisch dichteren (Brechungsindex n_1) in ein optisch dünneres Medium (Brechungsindex n_2) wird die Welle gemäß dem Snelliusschen Gesetz gebrochen³³. Beim Überschreiten eines kritischen Winkels ϑ_c :

$$\vartheta_c = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (4.11)$$

der nur vom Verhältnis der beiden Brechungsindizes abhängig ist, ist keine Ausbreitung in das optisch dünnere Medium mehr möglich und die Welle wird total reflektiert. Aus den Maxwell-Gleichungen ergeben sich Stetigkeitsbedingungen für das elektrische Feld an der Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes, aus denen folgt, dass sich die Ausbreitungsrichtung der einfallenden Welle nicht schlagartig ändern kann. Im Fall einer Totalreflexion, fällt die Amplitude des E-Feldes nicht unstetig auf Null, sondern es bildet sich eine stehende Welle aus dem einfallenden und reflektierten Strahl auf der Oberfläche aus, die ebenfalls in das nachfolgende optisch dünnere Medium eindringt und dort exponentiell abklingt. So eine Welle wird evaneszente Welle genannt. Mathematisch bedeutet dies, dass sie einen komplexen Wellenvektor $\vec{k}$ hat und beschrieben wird als³⁴:

$$E(z) = E_0 e^{-\frac{z}{d_p}} \quad (4.12)$$

wobei z die Ausbreitungsrichtung ist, wenn die Grenzfläche zwischen den zwei Medien in der xy -Ebene liegt, E_0 die Feldamplitude an der Grenzfläche, die exponentiell mit dem Abstand z von der Oberfläche abfällt und d_p die Eindringtiefe (engl.: depth of penetration) der evaneszenten Welle³⁵:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \vartheta_1 - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}} \quad (4.13)$$

wobei λ die Wellenlänge und ϑ_1 der Einfallswinkel (Winkel zwischen der einfallenden Welle und der Grenzflächennormalen) sind. Die Eindringtiefe ist definiert als der Abstand von der Grenzfläche, bei dem die Amplitude des E-Feldes auf das $(1/e)E_0$ ($\approx 37\%$) abgefallen ist⁴.

So eine Welle wird in der ATR-Spektroskopie ausgenutzt um stark absorbierende dünne Schichten zu untersuchen, die auf für IR-Licht transparente Kristalle (Si, Ge, ZnSe etc.) angebracht sind. Dabei kann die einfallende IR-Strahlung einmal oder mehrmals innerhalb des Kristalls reflektiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Si-Kristall verwendet, bei welchem der IR Strahl nur einmal intern reflektiert wird.

4.1.2 Oberflächenverstärkte ATR-FTIR Spektroskopie (SEIRAS)

Die Intensität der Absorption im IR-Bereich von Molekülen, die an raue metallische Oberflächen (z.B. Au, Ag etc.), z.B. an dünne Schichten aus metallischen Inseln oder metallischen Nanopartikeln adsorbiert sind, wird um 10-1000 mal verstärkt³⁶. Diese Methode wird als oberflächenverstärkte Infrarot Absorption Spektroskopie (engl.: Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy - SEIRAS) bezeichnet. Sie senkt die Detektionsgrenze der Infrarotspektroskopie und ermöglicht somit die Anwendung dieser Messtechnik auch auf sehr dünne biologische Schichten wie Proteine und biologische Membranen. SEIRAS kann in fast allen experimentellen Konfigurationen der IR-Spektroskopie (Transmission, externe Reflexion, etc.) angewendet werden und wurde in dieser Arbeit in der ATR-Konfiguration eingesetzt. Die Verstärkung hängt stark von der Rauigkeit und Morphologie der Oberfläche ab. Elektrothermisch bedampfte metallische Oberflächen, chemisch aufgebaute metallische Nanopartikel sowie metallische Kolloide zeigen eine besonders gute Verstärkung (Osawa³⁶ und darin enthaltene Referenzen). Die Reichweite der Verstärkung liegt bei ungefähr 5 nm³⁶, was den Verstärkungseffekt nur für die erste, auf der Metalloberfläche adsorbierte, molekulare Monoschicht relevant macht. Dies bedeutet, dass das Signal der Bulk-Phase unterdrückt wird, was zusätzlich das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert.

Seitdem dieser Effekt in den 1980er Jahren entdeckt wurde³⁷, haben sich bis jetzt zwei Mechanismen etabliert, die zu seiner Erklärung beitragen. Der erste basiert auf der Wechselwirkung der einfallenden elektromagnetischen Strahlung mit der metallischen Oberfläche, wodurch ein lokales elektrisches Feld auf der Oberfläche erzeugt wird, das stärker ist als das der einfallenden Strahlung. Dieser Mechanismus ist als der elektromagnetische Mechanismus bekannt. Der zweite beruht auf der chemischen Wechselwirkung zwischen den adsorbierten Molekülen und der Metalloberfläche selbst, was zu einer Vergrößerung des Absorptionskoeffizienten führt, und wird als der chemische Mechanismus in der Literatur bezeichnet. Beide Mechanismen tragen zum Verstärkungseffekt bei, wobei im IR-Bereich die Verstärkung hauptsächlich durch den elektromagnetischen Mechanismus verursacht wird. Eine detaillierte Beschreibung beider Mechanismen befindet sich in der zusammenfassenden Arbeit von Osawa³⁶.

Eine charakteristische und wichtige Eigenschaft von SEIRAS ist die sogenannte Oberflächen-Auswahlregel (engl.: surface selection rule), die die Selektivität der

Oberflächenverstärkung in Bezug auf die Orientierung der absorbierenden Dipole beschreibt: nur diejenigen Dipole, die senkrecht zur Metalloberfläche orientiert sind, werden vorzugsweise verstärkt. Diese Besonderheit ist von äußerster Bedeutung bei der Interpretation von SEIRA Spektren und wird auch ausgenutzt, um Aufschluß über die Orientierung der Moleküle zu gewinnen.

Zusätzlich ist die Absorption von der Polarisierung der einfallenden Strahlung abhängig. In der vorliegenden Arbeit wurde parallel polarisierte Strahlung verwendet, da nur diese eine Komponente des elektrischen Feldes senkrecht zur Metalloberfläche besitzt, die effektiv die Metallschicht durchdringen kann. Komponenten des E-Feldes die in der Ebene der Metallschicht liegen werden im Metall kurzgeschlossen und können nicht zur Absorption beitragen.

Damit eine geringe Konzentration an Molekülen (100 nM), sowie in der vorliegenden Arbeit aufgebaute Monoschicht von Proteinen überhaupt detektierbar ist, ist der Verstärkungseffekt von essentieller Bedeutung. Zu diesem Zweck wurde für die Experimente in dieser Arbeit die von Nowak et al.³⁸ vorgeschlagene two-layer Goldoberfläche (s. 7.A.3) verwendet. Sie ermöglicht eine gleichzeitige Anwendung von elektrochemischen, sowie Infrarotspektroskopischen Messungen, ist sowohl konsistent bei der Adhäsion und Leitfähigkeit als auch stabiler über die Zeit, was für die langdauernde Messungen von Proteinen wichtig ist. Zudem kann sie, bei optimalen Bedingungen, eine Verstärkung um bis zu einem Faktor 5^{38} größer im Vergleich zur klassischen SEIRAS-Oberflächen liefern.

4.1.3 Infrarotspektroskopie an Proteinen

Die Bausteine von Proteinen sind Aminosäuren. Proteine stellen eine Polymerkette dar, die eine Kombination aus 20 unterschiedlichen, in der Natur vorkommenden Aminosäuren ist²³. Alle proteinbildende Aminosäuren weisen eine gemeinsame Grundstruktur auf. Sie besitzen eine Aminogruppe (NH_2 , NH_3^+), eine Carboxylgruppe (COOH , COO^-), ein Wasserstoffatom und ein Rest R, die alle an einem sogenannten α -Kohlenstoffatom gebunden sind. In Proteinen ist die Aminogruppe einer Aminosäure mit der Carboxylgruppe einer anderen Aminosäure gebunden durch die Peptidbindung (CONH , auch Amidbindung genannt). Viele durch Peptidbindungen verknüpfte Aminosäuren bilden eine Polypeptidkette, die eine strukturelle Richtung aufweist, da ihre Bausteine zwei unterschiedliche Enden besitzen, nämlich die Aminogruppe (auch N-Terminus genannt) und die Carboxylgruppe (auch C-Terminus genannt). Definitionsmäßig beginnt die Polypeptidkette beim N-Terminus und endet mit dem C-Terminus.

Die Peptidbindung ist starr und planar, wobei der Wasserstoff fast immer in trans-Position zum Sauerstoff liegt (Abb. 4.4). Die partielle Doppelbindung zwischen dem Kohlenstoff und dem Stickstoff verhindert eine Rotation um diese Bindung. Die Peptidgruppe ist durch ein großes Dipolmoment ausgezeichnet und besitzt charakteristische Normalschwingungen, die Amid-Schwingungen genannt werden. Somit weist ein Infrarotspektrum eines beliebigen Proteins charakteristische Absorptionsbanden, die von den Peptidbindungen stammen, die Amid-Banden genannt werden (s. Tabelle 4.1). Das Auftreten von Amid-Banden in einem IR Spektrum deutet auf die Anwesenheit von Proteinen hin. Bei der theoretischen Berechnung der Normalschwingungen der Amidgruppe wird ein vereinfachtes Modell verwendet (Abb. 4.4).

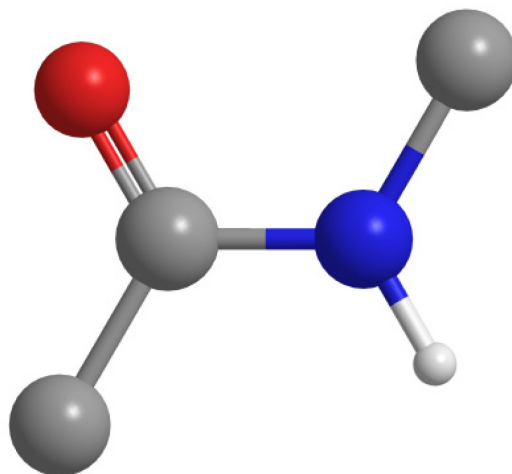


Abbildung 4.4: Modell der Peptidbindung. Rot – Sauerstoff, blau – Stickstoff, grau – Kohlenstoff, weiß – Wasserstoff

Quelle: ⁴

Neben den zentralen Atomen der Amidbindung C, O, N und H werden die angrenzenden Strukturen, inklusive der α -C Atome, nur mehr als zwei einzelne Teilchen betrachtet. Die Normalkoordinatenanalyse der 6 Teilchen ergibt $3 \cdot 6 - 6 = 12$ (s. 4.1) Normalschwingungen. Experimentell sind allerdings nur neun Amid-Banden anerkannt. Diese sind in der Tabelle 4.1 aufgetragen.

Tabelle 4.1: Anerkannte Amid-Banden mit zugehörigen Frequenzen und Zusammensetzungen. Quelle: ⁴

Symmetrie	Bezeichnung	Ungefähre Frequenz / cm^{-1}	Zuordnung
In-plane (in der Ebene)	Amid A	3300	NH_s (100%)
	Amid B	3100	NH_s (100%)
	Amid I	1650	CO_s (80%), CN_s , CCN_d
	Amid II	1550	NH_{ib} (60%), CN_s (40%), CO_{ib} , CC_s , NC_s
Out-of-plane (aus der Ebene heraus)	Amid III	1300	CN_s (40%), NH_{ib} (30%), CC_s (20%), CO_{ib}
	Amid IV	725	NH_{ob} , CN_t
	Amid V	625	CO_b (40%), CC_s (30%), CNC_d
	Amid VI	600	CO_{ob} , CN_t
	Amid VII	200	NH_{ob} , CN_t , CO_{ob}

Die Amid A, Amid I und Amid II Banden sind meistens die ausgeprägtesten Banden und werden am häufigsten für die Strukturaufklärung von Proteinen benutzt. Die Amid I Bande besteht zu $\approx 80\%$ aus der C=O Streckschwingung, die von der Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen im Peptidrückgrat abhängt, welche eine wesentliche Rolle für die Stabilisierung der Sekundärstruktur der Proteine spielen. Deswegen ist die Amid I Bande die am häufigsten benutzte Bande bei der Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen. Allerdings bestehen Proteine meistens aus mehreren Sekundärstruktur-Elementen (α -Helices, β -Faltblatt, random coil etc.), die unterschiedlich starke Wasserstoffbrückenbindungen besitzen. Somit wird die Amid I Bande in mehrere Komponenten aufgespalten und stellt eine komplexe Überlagerung einzelner, überlappender Schwingungsmoden dar. Die Amid II Bande besteht hauptsächlich aus der N-H Biegeschwingung ($\approx 60\%$) und der C-N Streckschwingung ($\approx 40\%$) und ist auch von der Sekundärstruktur des Proteins abhängig. Zusätzlich zu den Amid Banden gibt es in einem IR-Spektrum auch Banden, die von den Seitenketten der einzelnen Aminosäuren stammen. Diese können Aufschluss über wichtige Abläufe innerhalb des Proteins geben, woran die Aminosäuren beteiligt sind, wie z.B. Protonentransport⁴.

4.2 Elektrochemische Impedanz Spektroskopie (EIS)

Die Elektrochemische Impedanz Spektroskopie (engl. electrochemical impedance spectroscopy, EIS) ist eine elektrochemische Standardmethode, die allgemein zur Analyse elektrischer Eigenschaften von Materialien angewandt wird. Wegen ihrer hohen Sensitivität findet sie auch Anwendung in der Charakterisierung von komplexeren Systemen, wie z.B. dünne biologische Schichten, die an einer Elektrode adsorbiert werden.

In dieser Arbeit wird EIS als komplementäre Technik zur Verfolgung der Formation der Protein-verankerten Lipid-Membran verwendet. Da sich die elektrischen Eigenschaften des Systems bei Adsorption von Molekülen an der Elektrode ändern, kann dies zur Überprüfung der einzelnen Präparationsschritte genutzt werden. So ist bei der Rekonstitution des Proteins in die ptBLM ein Anstieg des Widerstands zu erwarten.

Bei EIS-Messungen wird typischerweise die Drei-Elektroden-Konfiguration verwendet³⁹. In der vorliegenden Arbeit dient die Goldoberfläche als Arbeitselektrode (engl. working electrode, WE), ein Platindraht ist die Gegenelektrode (engl. counter electrode, CE). Weiters wird in dieser Arbeit eine Ag/AgCl Elektrode als Referenzelektrode (RE) verwendet. Eine Referenzelektrode wird benötigt, um die Potentialdifferenz messen zu können, wobei zwischen Arbeits- und Referenzelektrode hochohmig gemessen wird, um einen Ohmschen Spannungsabfall an der Referenzelektrode zu vermeiden. Die Grundlage einer EIS-Messung besteht darin, bei einer angelegten Wechselspannung zwischen Arbeits- und Referenzelektrode die Phase und Amplitude der Stromantwort des Systems an der Gegenelektrode zu messen. Dies wird für eine Reihe verschiedener Frequenzen wiederholt, weswegen auch der Name Spektroskopie für diese Technik angenommen wurde.

Die Impedanz oder Wechselstromwiderstand ist ein Maß für den Widerstand eines Schaltkreises, wenn dieser an Wechselspannung angeschlossen wird. Diese Größe ist mathematisch eine komplexwertige Funktion und beinhaltet neben der Amplitude auch Information über die Phasenverschiebung des Stromes⁴⁰. Somit stellt die Impedanz eine Erweiterung des Konzepts des elektrischen Widerstands dar. Die Gesamtimpedanz setzt sich im Allgemeinen nicht nur aus Ohmschen Widerständen zusammen. Diese sind frequenzunabhängige Elemente, während kapazitative und induktive Elemente auch zur

Resistivität des Systems bei Wechselstrom beitragen und zudem eine frequenzabhängige Phasenverschiebung zwischen Spannung und Strom bewirken. In der mathematischen Beschreibung wird dieser Sachverhalt als der imaginäre Teil der Impedanzfunktion miteinbezogen. In biologischen Systemen liegen vor allem Ohmsche und kapazitative Widerstände als äquivalente Schaltelemente vor. Deswegen werden induktive Elemente in dieser Arbeit nicht weiter betrachtet.

Um die Linearität des Systems und der Stromantwort zu behalten wurde in diesen Messungen eine Amplitude von 10 mV für die Anregung ausgewählt, was bei Raumtemperatur von 25 °C gut unter der thermischen Spannung, $V_T \equiv RT/F = kT/e \approx 25$ mV, liegt³⁹. Hier ist k die Boltzmann Konstante, T die absolute Temperatur, e die Elementarladung, R die allgemeine Gaskonstante und F die Faraday-Konstante. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Frequenzbereich zwischen 10^{-3} Hz und 100 kHz gewählt.

Das System wird mit einer sinusförmigen Wechselspannung der Form³⁹

$$E(t) = E_0 \cdot \sin(\omega t) \quad (4.14)$$

angeregt, wobei E_0 die Amplitude der Spannung und ω die Kreisfrequenz sind. Die Kreisfrequenz hängt über $\omega = 2\pi\nu$ mit der Frequenz der Spannung zusammen. Der Strom, der durch diese Spannung hervorgerufen wird, unter Voraussetzung der Linearität, hat dann die Amplitude I_0 und ist bei gleicher Frequenz um die Phase φ verschoben:

$$I(t) = I_0 \cdot \sin(\omega t + \varphi) \quad (4.15)$$

Analog zum Ohmschen Gesetz, ist die Impedanz dann durch

$$Z(t) = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 \cdot \sin(\omega t)}{I_0 \cdot \sin(\omega t + \varphi)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \varphi)} \quad (4.16)$$

gegeben. Mit Hilfe der Eulerschen Relation

$$e^{i\varphi} = \cos \varphi + i \sin \varphi \quad (4.17)$$

lassen sich diese Größen in der komplexen Schreibweise darstellen, was die mathematische Behandlung vereinfacht. Somit ergibt sich für³⁹

$$E(t) = E_0 \cdot e^{i\omega t} \quad I(t) = I_0 \cdot e^{i\omega t - \varphi} \quad (4.18)$$

$$\Rightarrow Z(t) = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 \cdot e^{i\omega t}}{I_0 \cdot e^{i\omega t - \varphi}} = \frac{E_0}{I_0} \cdot e^{i\varphi} = |Z| \cdot e^{i\varphi} = Z' + iZ'' \quad (4.19)$$

was zu zwei Schlussfolgerungen führt. Einerseits ist die Impedanz zeitunabhängig geworden, was eine Zeitunabhängigkeit des zu untersuchenden Systems voraussetzt. Andererseits ist sie jetzt eine komplexe Zahl, die sich in ihrem Realteil (Resistanz) und Imaginärteil (Reaktanz) aufspalten lässt. Gemäß der Eulerschen Relation sind diese durch

$$Z' = \operatorname{Re}(Z) = |Z| \cdot \cos \varphi \quad Z'' = \operatorname{Im}(Z) = |Z| \cdot \sin \varphi \quad (4.20)$$

gegeben, wobei der Betrag $|Z|$ und das Argument φ (Phasenverschiebung) durch

$$|Z| = \sqrt{(Z')^2 + (Z'')^2} \quad \varphi = \arctan\left(\frac{Z''}{Z'}\right) \quad (4.21)$$

gegeben sind.

Eine weitere, hilfreiche Größe, die sich aus der Impedanz ableiten lässt, ist die Admittanz. Sie ist definiert durch³⁹

$$Y \equiv \frac{1}{Z} = \frac{1}{Z' + iZ''} = \frac{Z'}{(Z')^2 + (Z'')^2} - \frac{iZ''}{(Z')^2 + (Z'')^2} = Y' + iY'' \quad (4.22)$$

$$\Rightarrow Y' = \frac{Z'}{(Z')^2 + (Z'')^2} \quad Y'' = \frac{-Z''}{(Z')^2 + (Z'')^2} \quad (4.23)$$

und stellt somit eine komplexe Leitfähigkeit dar. Der Realteil Y' wird Konduktanz und der Imaginärteil Y'' Suszeptanz genannt.

Bei einer EIS-Messung wird über einen bestimmten Frequenzbereich gemessen, wobei die Amplitude E_0 der Anregung gleich bleibt. Zu jeder Frequenz werden der resultierende Strom I_0 und die dazugehörige Phasenverschiebung φ gemessen. So ergibt sich zu jeder Frequenz ein Wertepaar von Z' und Z'' . Daraus lassen sich weitere Größen ableiten wie z.B. Y' und Y'' . In der EIS lassen sich diese Ergebnisse in vielen verschiedenen Plots kombinieren und darstellen³⁹.

In dieser Arbeit werden folgende EIS-Plots verwendet:

Bode-Plot ist eine kombinierte graphische Darstellung, wobei sowohl der Betrag der Impedanz $|Z|$, als auch die Phase φ in Abhängigkeit der Frequenz aufgetragen werden ($|Z| = f(\nu)$ und $\varphi = f(\nu)$). Da während einer Messung viele Größenordnungen der Frequenz durchlaufen werden und sich dabei auch der Betrag der Impedanz über viele Größenordnungen ändert, werden diese Größen auf einer logarithmischen Skala aufgezeichnet.

Frequenznormierter Admittanz-Plot ist eine weitere, günstige Darstellungsform, bei der Real- und Imaginärteil der Admittanz mit der Kreisfrequenz normiert werden und $-Y''/\omega$ in Abhängigkeit von Y'/ω aufgetragen wird ($-Y''/\omega = f(Y'/\omega)$). Da die frequenznormierte Admittanz die Dimension einer Kapazität hat, kann man in diesem Plot, sowohl deutliche Änderungen in der Kapazität des Systems sehen, als auch diese direkt an der Skala ablesen.

Die Auswertung der gemessenen Impedanzspektren erfolgt durch Simulation von Ersatzschaltkreisen (engl.: equivalent circuit), in denen die gewählten Schaltkreiselementen möglichst der physikalischen Situation des Systems entsprechen. Für das in dieser Arbeit verwendete Membransystem, wurden folgende Schaltkreiselemente für die Simulation verwendet³:

Ohmscher Widerstand. Die Impedanz eines rein Ohmschen Widerstands ist gegeben durch

$$Z = R \quad (4.24)$$

Hieraus ist ersichtlich, dass ein Ohmscher Widerstand frequenzunabhängig ist. Außerdem sind Strom und Spannung in Phase, d.h. $\varphi = 0$.

Kapazität (C). Für ein rein kapazitatives Element, z.B. einen Kondensator, in einem Wechselstromkreis gilt

$$Z(C) = -\frac{i}{\omega C} \quad (4.25)$$

Dies bedeutet, dass $Re(Z) = Z' = 0$ ist und $Im(Z) = Z''$ stets negativ und ungleich 0 ist. Deswegen ist $\varphi = \arctan(Z''/Z') = -90^\circ$, was bedeutet, dass Strom und Spannung immer Phasenverschoben sind, bzw. eilt der Strom der Spannung um $\pi/2$ voraus.

Constant phase element (CPE). Für die Simulation realer Systemen reichen die oben beschriebenen Elemente nicht aus, da sie ideale bzw. konstante Eigenschaften besitzen. Reale Systeme besitzen dagegen eine Verteilung von Eigenschaften, die mit der Einführung sogenannter constant phase elements (CPEs) angenähert werden können. Die Impedanz eines CPEs ist definiert als

$$Z = \frac{1}{Y_0} \cdot (i\omega)^{-\alpha} \quad (4.26)$$

Wobei Y_0 einer Kapazität entspricht und für α gilt: $0 < \alpha < 1$. Je näher α bei 1 liegt, desto mehr entspricht das CPE einem Kondensator. Obwohl es einige Theorien für die Erklärung dieses nichtidealen Verhaltens gibt, das z.B. auf mikroskopische Eigenschaften, Oberflächenrauigkeit, inhomogene Stromverteilung etc. zurückzuführen ist, ist es am besten α als eine empirische Konstante, ohne physikalische Bedeutung, anzunehmen³⁹.

Für komplexere Systeme, wie in dieser Arbeit zu untersuchenden ptBLM-System, kommt es zur Überlagerung der oben genannten Elemente (s. 5.1.2). Zur Aufnahme der Daten, sowie ihrer Auswertung wurde das Programm Nova 1.7 verwendet.

4.3 Surface Plasmon Resonance (SPR) Spektroskopie

Die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (engl.: Surface Plasmon Resonance, SPR) ist eine spektroskopische Messmethode mit der sich Schichtdicken im Nanometerbereich an einer Grenzfläche Metall/dielektrische Schicht relativ einfach bestimmen lassen.

Die kollektiven Oszillationen des quasi-freien Elektronengases in einem Metall relativ zu den Ionenrümpfen werden Plasmonen genannt⁴¹. An einer Grenzfläche zwischen einem Metall und einem Dielektrikum kann es, unter bestimmten Bedingungen, durch einer einfallenden elektromagnetischen Welle zur Anregung dieser elektronischen Schwingungen parallel zur Grenzfläche kommen, die Oberflächenplasmonen oder auch plasmonische Oberflächenpolaritonen genannt werden. Sie sind evaneszente Oberflächenwellen, die an der einfallenden elektromagnetischen Welle gekoppelt sind und ihr Intensitätsmaximum an der Metalloberfläche besitzen, wodurch die resultierende Feldstärke im Raum über der metallischen Oberfläche verstärkt wird. Allerdings werden sie auf Grund von Leitungsverlusten im Metall stark entlang ihrer Ausbreitungsrichtung, i.e. parallel zur Oberfläche, gedämpft und ihre Intensität nimmt exponentiell ab. Dabei wird fast die gesamte Energie in Wärme umgewandelt.

Angenommen liegt die Metall/Dielektrikum Grenzfläche in der xy -Ebene. Die optischen Eigenschaften beider Medien werden durch ihre komplexe, frequenzabhängige dielektrische Funktionen $\epsilon_m(\omega)$ (für das Metall) bzw. $\epsilon_d(\omega)$ (für das Dielektrikum) beschrieben. Oberflächenplasmonen können nur von einer elektromagnetischen Welle, die eine Komponente des elektrischen Feldes normal zur Oberfläche ($\parallel \vec{z}$) besitzt, d.h. eine Oberflächenladungsdichte induzieren kann, angeregt werden. Senkrecht polarisiertes Licht besitzt nur eine E -Feld Komponente, die parallel zur Oberfläche (i.e senkrecht zur Einfallsebene) verläuft und ist somit unfähig Oberflächenplasmonen anzuregen. Aus diesem Grund wird nur parallel polarisiertes Licht verwendet. Aus der Herleitung der Feldverteilung der Oberflächenplasmonen durch die Maxwell-Gleichungen und unter Berücksichtigung der Stetigkeitsbedingungen des elektrischen und magnetischen Feldes an der Grenzfläche, ergibt sich für die Dispersionsrelation der Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche⁷

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{(\varepsilon_m + \varepsilon_d)}} \quad (4.27)$$

wobei x die Ausbreitungsrichtung des Oberflächenplasmons ist, c ist die Lichtgeschwindigkeit und ω ist die reelle Kreisfrequenz. Da ε_m komplex ist, ist k_x auch komplex, d.h. $k_x = k'_x + ik''_x$. Daraus folgt, dass das Oberflächenplasmon, das entlang der Metall/Dielektrikum Grenzfläche propagiert eine endliche Ausbreitungslänge L_x aufweist, die durch $L_x = 1/k''_x$ gegeben ist. Zusätzlich ist die z -Komponente des Wellenvektors des Oberflächenplasmons rein imaginär, was zur Folge hat, dass das Oberflächenplasmon eine nichtstrahlende evaneszente Welle ist, mit einer maximalen Feldamplitude an der Oberfläche, die exponentiell, sowohl in das Dielektrikum, als auch in das Metall abklingt. Dieses Verhalten einer evaneszenten Welle wird durch ihre Eindringtiefe charakterisiert⁷,

$$l = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{(n \cdot \sin \theta)^2 - 1}} \quad (4.28)$$

die eine Funktion des Brechungsindex n und des Einfallswinkels θ ist und ungefähr die halbe Wellenlänge λ beträgt. Erwähnenswert hier ist die Schlussfolgerung, dass alle Parameter, die die Eigenschaften eines Oberflächenplasmons charakterisieren, z.B. die Eindringtiefe, können quantitativ durch die dielektrische Funktion ($n = \sqrt{\varepsilon}$) der Medien beschrieben werden. Sie beträgt nur einige Nanometer und es ist genau diese Oberflächenselektivität, die dieses evaneszente Feld zur Probenuntersuchung interessant macht.

Die Dispersionsrelation eines freien Photons im Dielektrikum ist gegeben durch⁷

$$k_{ph} = \frac{\omega}{c} \cdot \sqrt{\varepsilon_d} \quad (4.29)$$

wobei $\omega = c_d \cdot k_{ph}$ mit der Lichtgeschwindigkeit im Dielektrikum $c_d = c/\sqrt{\varepsilon_d}$ und $n_d = \sqrt{\varepsilon_d}$ dem Brechungsindex des Mediums gegeben ist. Allerdings, kann nur die Projektion dieses Wellenvektors auf die x -Achse (Ausbreitungsrichtung) zur Anregung des Oberflächenplasmons beitragen

$$k_{ph}^x = \frac{\omega}{c} \cdot \sqrt{\varepsilon_d} \cdot \sin \theta \quad (4.30)$$

Für die Reflexion einfallender Photonen an der Metall/Dielektrikum Grenzfläche, die z.B. aus einem Laser (mit Energie $\hbar\omega_L$) kommen, bedeutet dies, dass man unter Veränderung des Einfallswinkels θ diese Komponente von null bis zum maximalen Wert des Wellenvektors einstellen kann. Vergleicht man Gleichung 4.27 mit Gleichung 4.29

$$\sqrt{\frac{\epsilon_m \cdot \epsilon_d}{(\epsilon_m + \epsilon_d)}} \geq \sqrt{\epsilon_d} \quad (4.31)$$

ist es sofort ersichtlich, dass dies nicht ausreichend für die resonante Anregung von Oberflächenplasmonen durch einfallende Photonen ist, da der Impuls der Photonen immer kleiner sein wird als der der Oberflächenplasmonen (Abb. 4.5a). Für die Kopplung beider elektromagnetischer Moden müssen zusätzlich zur Energieerhaltung auch die Impulskomponenten dieser Moden übereinstimmen⁷.

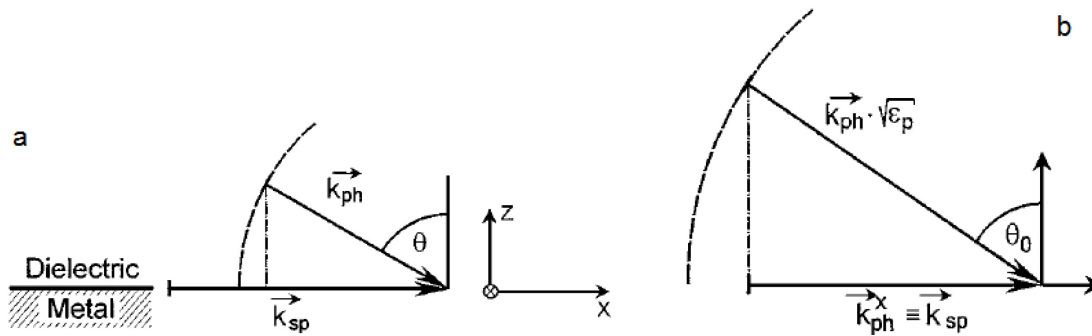


Abbildung 4.5: a) Impulsverhältnis zwischen dem sich entlang der x -Achse ausbreitenden Oberflächenplasmon $\vec{k}_{sp}$ und dem auf der Metal/Dielektrikum Grenzfläche einfallenden Photon $\vec{k}_{ph}$. Für alle einfallende Winkel θ gilt $|\vec{k}_{ph}| < |\vec{k}_{sp}|$. Die Metal/Dielektrikum Grenzfläche liegt in der xy -Ebene. b) Wellenvektor Übereinstimmungsbedingung für die resonante Kopplung von sich im Prisma ausbreitende Photonen: Beim Einfallswinkel θ_0 , die Photonprojektion auf der x -Achse $\vec{k}_{ph}^x$ stimmt mit dem Wellenvektor des Oberflächenplasmons $\vec{k}_{sp}$.

Quelle: ⁷

Eine Möglichkeit, diese Bedingung zu erfüllen und die Impulskomponente der einfallenden Photonen zu vergrößern, ist durch Verwendung eines Dielektrikums mit einem hohen Brechungsindex, wie z.B. ein Prisma aus einem hochbrechenden Material (mit $\epsilon_p > \epsilon_d$) gegeben (Abb. 4.5b). Somit dient das Prisma als ein Kopplungsinstrument

und kann in unterschiedlichen experimentellen Konfigurationen eingesetzt werden. Die meist verbreitete und in dieser Arbeit auch eingesetzte Konfiguration ist die Kretschmann-Konfiguration, wobei eine dünne Goldschicht (typischerweise 40 – 50 nm dick) an einen Objektträger angebracht wird (s. 7.A.1), der mit einer index-match Flüssigkeit an der Basis des Prisma in Kontakt gebracht wird. Hierbei ist zu beachten, dass auf Grund der kleinen Dicke der Metallschicht, die Photonen im Prisma an den Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche der anderen Goldseite koppeln, dessen evaneszentes Feld zur Untersuchung dünner dielektrischer Schichten an dieser Metall/Dielektrikum Grenzfläche ausgenutzt werden kann (Abb. 4.6).

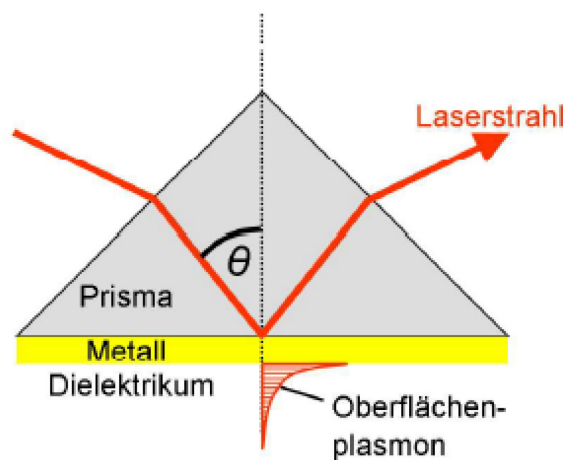


Abbildung 4.6: Oberflächenplasmonenanregung in der Kretschmann-Konfiguration. Eine dünne Metallschicht (Gold, $d \approx 43$ nm) wird an der Basisfläche eines Prismas angebracht und dient als Resonator für das E -Feld des einfallenden Photons. Die Probe, die auf der Goldoberfläche angebracht wird, wird durch das evaneszente Feld „beleuchtet“.

Quelle: ³

Meßprinzip der SPR-Spektroskopie

Parallel polarisiertes Licht mit einer Wellenlänge von 632,8 nm (He-Ne Laser) wird an der Grenzfläche Gold/dielektrische Schicht an der Basis eines Prismas reflektiert und weiter zum Detektor geleitet, wo die reflektierte Intensität gemessen wird. Dabei wird die Reflektivität, die das Verhältnis der reflektierten zur einfallenden Intensität darstellt, $R = I_{ref}/I_{ein}$, in Abhängigkeit vom Einfallswinkel θ aufgezeichnet (Abb. 4.7).

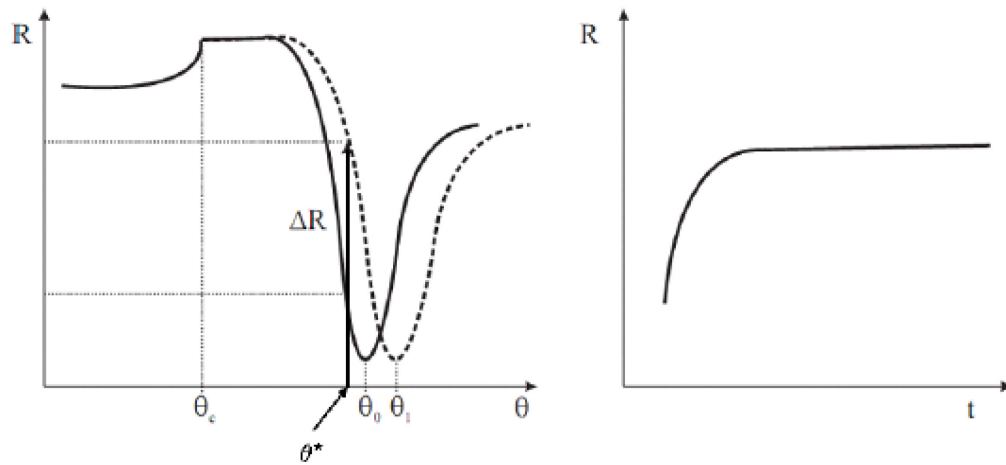


Abbildung 4.7: Reflektivität in Abhängigkeit des Einfallswinkels θ – Winkelscan (links), vor (durchgezogene Linie) und nach Adsorption (gestrichelte Linie) einer dielektrischen Schicht auf der Metalloberfläche. Reflektivität in Abhängigkeit der Zeit – Kinetikmessung (rechts) bei einem aus dem linearen Bereich der Winkelscankurve festem Winkel θ^* .

Quelle: ⁵

Für Einfallswinkel kleiner als der kritische Winkel der Totalreflexion $\theta < \theta_c$ ist die Reflektivität ziemlich groß, da die Metallschicht eine spiegelnde Oberfläche darstellt, an der die Transmission klein ist. Ab dem Grenzwinkel der Totalreflexion θ_c tritt Totalreflexion auf und die Kurve zeigt maximale Reflektivität. Für $\theta > \theta_c$ nimmt sie ab und besitzt ein Minimum bei θ_0 , dem Winkel der Resonanz, bei dem die Anregung der Oberflächenplasmonen stattfindet und somit das ganze einfallende Licht in die Metallschicht eingekoppelt wird. Durch Adsorption einer dünnen dielektrischen Schicht an der Metalloberfläche ändert sich die Dispersionsrelation der Oberflächenplasmonen entlang der modifizierten Grenzfläche, was zu einer Verschiebung des Resonanzwinkels (von θ_0 auf θ_1) führt. Dabei bleibt der Winkel der Totalreflexion unverändert. Diese Verschiebung ist proportional zur Schichtdicke der dielektrischen Schicht $d_{Schicht}$ und dem Unterschied der dielektrischen Konstanten beider Medien

$$\Delta\theta = f(d_{Schicht}, (\varepsilon_{Schicht} - \varepsilon_d)) \quad (4.32)$$

Die gemessene Kurve kann mit einem auf der Fresnelschen Gleichungen basierten Algorithmus in der Software Winspill angefitet werden, wobei von den erhaltenen Parameter, bei bekannten Brechungsindices beider Medien (und somit $\varepsilon_{Schicht}$ und ε_d), die Schichtdicke ausgerechnet werden kann. Zusätzlich kann Information über die

Kinetik des Adsorptionsvorganges der dielektrischen Schicht erhalten werden, in dem die Reflektivität bei einem festen Winkel θ^* in Abhängigkeit von der Zeit aufgenommen wird. Dabei ist der Winkel θ^* aus dem linearen Bereich der Kurve zu wählen um einen möglichst regelmäßigen und linearen Zusammenhang beider Kurven und somit eine quantitative Auswertung der Kinetik zu gewährleisten⁷.

5. Resultate und Diskussion

5.1 Immobilisierung und Rekonstitution des RC in die ptBLM

5.1.1 Verfolgung mittels SPR

Die SPR-Messungen wurden in der Kretschmann-Anordnung mittels einer PTFE Messzelle, die die simultane Messung von SPR und EIS ermöglicht¹⁴ durchgeführt. Der TSG-Glasobjekträger wurde mittels einer index-match Flüssigkeit an der Basis eines 90° Prismas angebracht. Die Oberflächenplasmonen wurden mit Licht eines He-Ne Lasers angeregt und durch das Prisma und schließlich zum Photodiodendetektor geleitet. Die Aufnahme der Änderung der Reflektivität bei einem aus dem linearen Bereich der SPR-Kurve festen Winkel als Funktion der Zeit, gibt Aufschluss über die zeitliche Entwicklung der Anbindung an der Goldoberfläche und die Rekonstitution des Proteins in die ptBLM. In Abb. 5.1 ist die Kinetik-Kurve sowie der einzelnen Präparationsschritte dargestellt.

Als erstes wird die Zelle mit Phosphatpuffer (PBS) und dann mit DDM-PBS (s. 7.B) befüllt. Zunächst wird das in DDM-PBS gelöste Protein in die Zelle gegeben. Sobald eine Sättigung in der Kurve zu sehen ist wird es mit DDM-PBS gespült, um Bulk- und unspezifisch adsorbiertes Protein aus der Zelle zu entfernen. Dann wird die Lipidlösung in die Zelle gegeben und schließlich die Biobeads (s. 7.A.3). Die zugehörige SPR-Spektren der einzelnen Präparationsschritte sind im Inset abgebildet und wurden im Programm Winspall mittels einem vier Schichten Model (Prisma, Gold, Protein, Lipid) angefüttet. Wenn der Brechungsindex konstant gehalten wird (es wird angenommen, dass das Protein und die Lipidmembran den gleichen Brechungsindex haben $n = 1,434$), kann die Schichtdicke berechnet werden. Die Parameter der Fit-Kurven sind in der Tabelle 5.1 zusammengefasst. Sie sind in guter Übereinstimmung mit den Messdaten aus früheren Arbeiten mit der Cytochrom *c* Oxidase⁴². Daraus kann man rückschließen, dass eine dicht gepackte Monoschicht an der Goldoberfläche angebunden ist, wobei die Lücken zwischen den Proteinen mit Lipiddoppelschicht ausgefüllt sind.

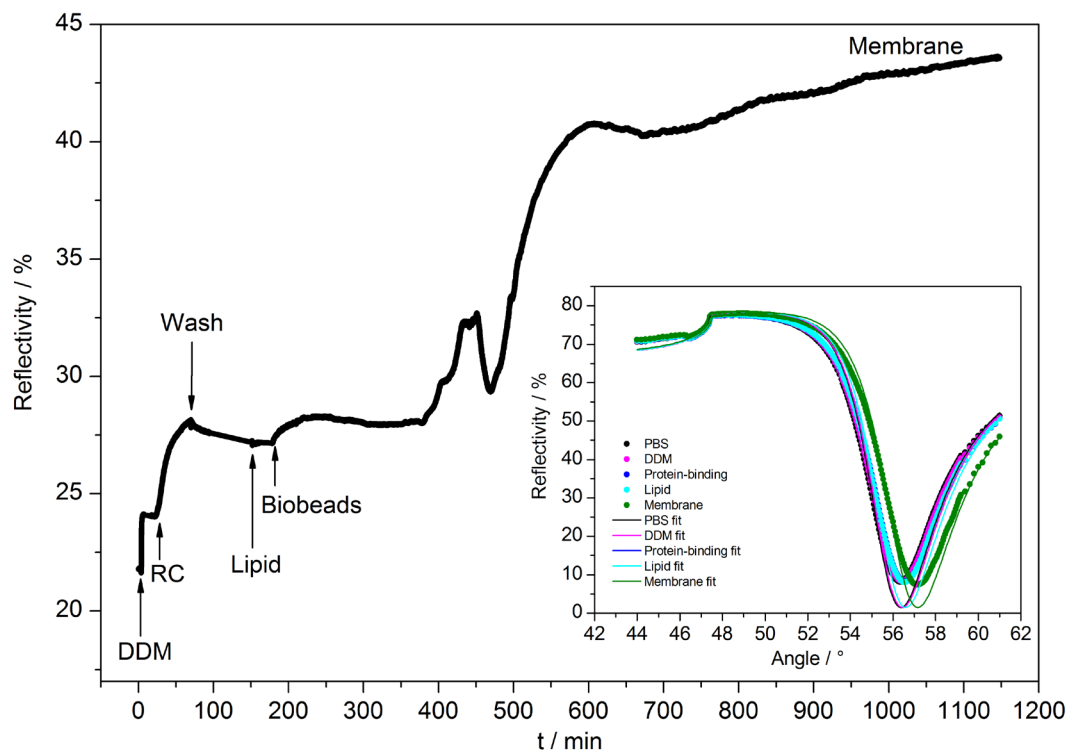


Abbildung 5.1: SPR-Kinetikmessung aufgezeichnet während der Immobilisierung des RC auf der NTA-funktionalisierten Goldoberfläche und anschließender Rekonstitution in die ptBLM bei festem Einfallswinkel (55°). Die zugehörige SPR-Winkelscans sind im Inset dargestellt. Volle Kreise repräsentieren die Messdaten, die durchgezogene Linien die zugehörige simulierte Kurven.

Tabelle 5.1: Optische Schichtdicken erhalten von den simulierten SPR-Spektren nach Proteinimmobilisierung bzw. Rekonstitution in die ptBLM.

	Schichtdicke [nm]	Brechungsindex n
Protein	1.2	1.434
Membran	6.1	1.434

5.1.2 Überprüfung mittels EIS

Die EIS-Messungen wurden mit dem Instrument Autolab durchgeführt (s. 7.C). Es wurde in der sogenannten drei-Elektroden-Anordnung gemessen, wobei die TSG-Oberfläche als Arbeitselektrode, eine $\text{Ag/AgCl, KCl}_{\text{sat}}$ als Referenzelektrode und ein Platindraht als Gegenelektrode dienten. Als Elektrolyt diente der Phosphatpuffer (s. 7.B). Impedanzspektren wurden im Frequenzintervall von 100 kHz bis 10 mHz mit einer Spannungsamplitude von 10 mV aufgenommen, zuerst nach der Immobilisierung des Proteins an der Goldoberfläche und nach der Rekonstitution in der ptBLM (Abb. 5.2). Die Messdaten wurden anschließend mit Hilfe eines Ersatzschaltkreises (Abb. 5.3) und einem auf dem Boukamp Model basierten Algorithmus, der in der Software Nova (Version 1.7) verfügbar ist, angefitet. Die Parameter der Fit-Kurven sind in der Tabelle 5.2 zusammengefasst.

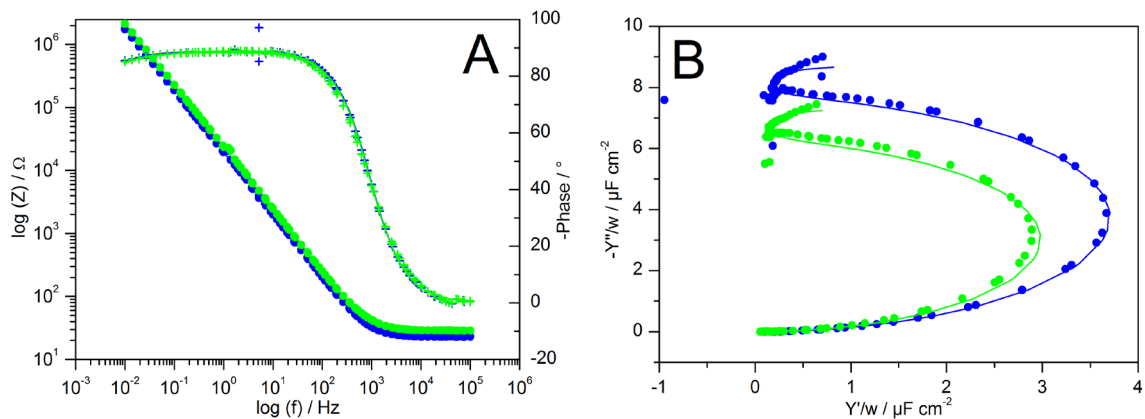


Abbildung 5.2: EIS-Spektren von RC immobilisiert auf der NTA-funktionalisierten Goldoberfläche (grün) und nach Rekonstitution in die ptBLM (blau). Volle Kreise repräsentieren die Messdaten, die durchgezogene Linien die Fit-Kurven. A-Bode Plot, B-Frequenz-normierte Admittanz Plot

Im Bode Plot (Abb. 5.2A) ist eine Erhöhung des Schichtwiderstands an der Goldoberfläche nach der Formation der ptBLM zu sehen, was darauf hindeutet, dass die Lücken zwischen den Proteinen mit der Lipiddoppelschicht ausgefüllt sind und somit der Ionenfluss behindert wird. Weiters ist in Abb. 5.2B ein deutlicher Rückgang der Schichtkapazität nach der Rekonstitution zu erkennen. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die dielektrische Konstante von Lipiden bei Raumtemperatur kleiner ist als die von Wassermolekülen, was die Ausbildung der ptBLM zusätzlich begründet.

Tabelle 5.2: Parameter der EIS-Fit-Daten erhalten mit dem Ersatzschaltkreis (Abb. 5.3) von der Proteinschicht vor und nach der Rekonstitution in die ptBLM

	$R_M / \text{M}\Omega \text{ cm}^{-2}$	$\text{CPE} / \mu\text{F cm}^{-2}$	α
Protein	25.3	8.34	0.986
Membrane	31.7	6.91	0.983

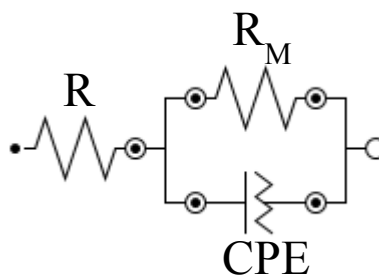


Abbildung 5.3: Elektrochemischer Ersatzschaltkreis verwendet für das Anfiten von EIS-Spektren vom in der ptBLM rekonstituierten RC. R repräsentiert den Widerstand des submembranen Raums, R_M den Widerstand (Resistanz) der Protein- bzw. ptBLM-Schicht. CPE ist ein constant phase element.

5.1.3 Ko-rekonstitution des RCs mit dem *bc₁*-Komplex

Analog zu den Abschnitten 5.1.1 und 5.1.2 wurden die zwei Proteine an der Goldoberfläche ko-immobilisiert und anschließend in die ptBLM ko-rekonstituiert.

In Abb. 5.4 ist die SPR-Kinetik der gleichzeitigen Anbindung und anschließende Ko-rekonstitution beider Proteinen in die ptBLM aufgezeichnet. Analog zum Fall vom RC alleine (s. oben), kann geschlossen werden, dass eine gemischte Monoschicht aus RC und *bc₁*-Komplex Proteinen an der Goldoberfläche aufgebaut ist, wobei die Lücken zwischen den einzelnen Proteinen mit einer Lipiddoppelschicht ausgefüllt sind.

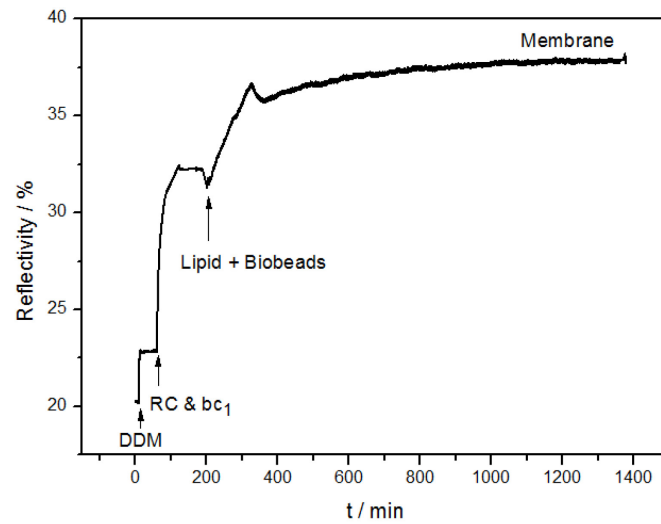


Abbildung 5.4: SPR-Kinetikmessung aufgezeichnet während der Ko-Immobilisierung des RC gemeinsam mit dem bc_1 -Komplex auf der NTA-funktionalisierten Goldoberfläche und anschließender Rekonstitution in die ptBLM.

5.2 Die Lichtanregung

5.2.1 SEIRAS von RC in der ptBLM

Immobilisierung des RC auf der two-layer Goldoberfläche

SEIRA Spektren wurden während der Anbindung des RC über den an der P-Seite des Proteins angebrachten His-Tag in Abhängigkeit der Zeit aufgenommen (Abb. 5.5)

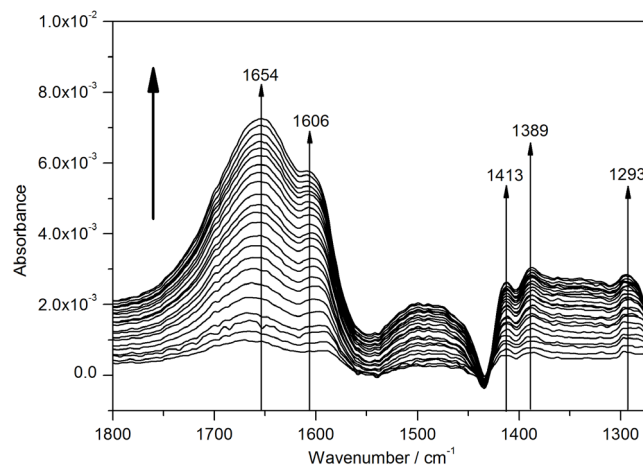


Abbildung 5.5: SEIRA Spektren von RC während der Immobilisierung auf der Goldoberfläche als Funktion der Anbindungszeit. Die Adsorptionsdauer war 4 h, die Intervalle zwischen den einzelnen Messungen waren 10 min. Das Spektrum der funktionalisierten Goldoberfläche diente als Referenz.

Schwingungskomponenten von α -Helices und β -Faltblättern im Amid I Bereich können erkannt werden bei 1654 und 1606 cm^{-1} , sowie zwei weitere Banden bei 1413 und 1389 cm^{-1} . Die letzte wurde zu einer kleinen Menge QH_2 , das während der Anbindung gebildet wird, zugeordnet, da die Probe nicht vom Licht abgeschirmt worden war¹⁵. Die Bande bei 1413 cm^{-1} entsteht auf Grund von Änderungen in der NTA Struktur während der Komplexbildung mit den His-Tag^{18a}. Die Bande bei 1293 cm^{-1} liegt im Amid III Bereich. Es sind wenig bzw. fast keine Amid II Banden in den Spektren erkennbar. Dies kann mit der Theorie von SEIRAS erklärt werden (s. 4.1.2), die besagt, dass nur senkrecht zur Oberfläche orientierte Dipole starker Verstärkung unterliegen und Dipole, die in anderen Richtungen orientiert sind, nicht indiziert werden³⁶. Außerdem, nimmt der Verstärkungseffekt mit zunehmendem Abstand von der Metalloberfläche ab. Die Proteine sind so an der Oberfläche angeordnet, dass die

α -Helices in die z-Richtung zeigen (Abb. 3.10), was zur starken Absorbanz im Amid I Bereich führt. Auf der anderen Seite sind random coil oder β -Faltblatt Strukturen, vertreten durch die Amid II Bande, nicht so gut orientiert und auch mehr von der Oberfläche entfernt. Deswegen ist ihre Absorbanz viel schwächer.

Markerbanden der Lichtaktivierung des RC

Als nächstes wurden Steady-State hell minus dunkel Differenzspektren vom in der ptBLM rekonstituierten RC aufgenommen, zunächst ohne zusätzliches Q₁₀. Insgesamt wurden 1000 scans bei kontinuierlicher Belichtung aufgenommen und gemittelt. Lichtinduzierte Absorbanzspektren mit dem als Referenz im Dunkeln aufgenommenen Spektrum sind in Abb. 5.6 dargestellt.

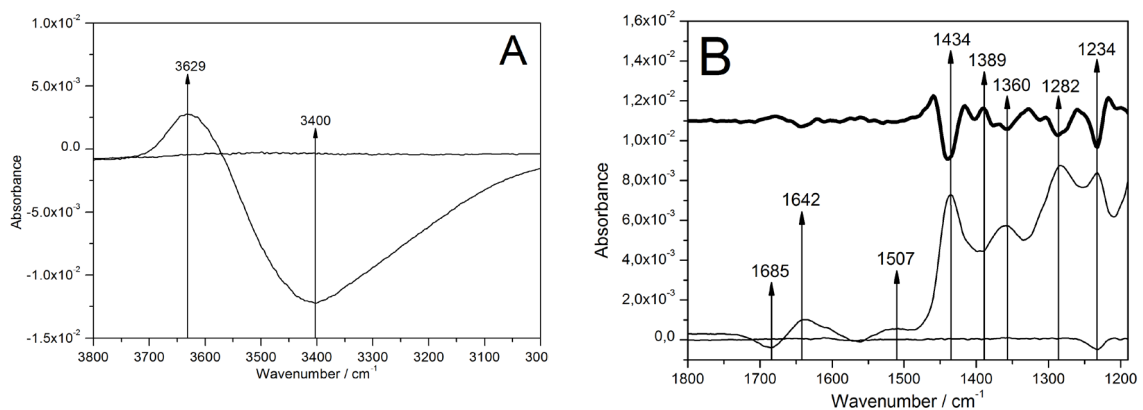


Abbildung 5.6: Hell minus dunkel Absorptionsspektren von RC rekonstituiert in die ptBLM nach 5 min. Belichtungszeit mit dem Spektrum im Dunklen als Referenz (dunkel minus dunkel) im oberen (A) und unteren (B) Wellenzahlbereich. Die dicke Linie in B repräsentiert die zweite Ableitung des Spektrums und weist eine Bande bei 1389 cm⁻¹ zwischen 1434 und 1360 cm⁻¹ auf. Aus der zweiten Ableitung ist es auch ersichtlich, dass die Bande bei 1642 cm⁻¹ eine Überlappung mehrerer Banden ist, die allerdings nicht in einzelne Banden aufgelöst werden kann.

Mehrere positive Banden bei 1234, 1282, 1360, 1434, 1507, 1642 cm⁻¹, sowie eine negative Bande bei 1685 cm⁻¹ werden sichtbar. Zwischen der 1360 und 1434 cm⁻¹ Bande ist eine Bande bei 1389 cm⁻¹ versteckt, die in der zweiten Ableitung des Spektrums in Abb. 5.6B zu sehen ist. Breite negative bzw. positive Banden entstehen bei 3400 bzw. 3629 cm⁻¹. Die prominenteste Bande bei 1434 cm⁻¹ ist von vielen Forschern QH₂ zugeordnet worden^{15, 16b, 16e, f}. Die Bande bei 1282 cm⁻¹ ist eine Markerbande für P⁺^{16g, 43}. Die Bande bei 1360 cm⁻¹ kann einem Semichinon, das im

Prozess der Q_B^- Bildung entsteht, zugeschrieben werden^{16c, 44}. Andere Banden, die auf Semichinon hinweisen, wurden von Gerwert et al.^{16c} bei 1446 und 1479 cm^{-1} berichtet, welche in diesen Spektren nicht zu sehen sind. Die Bande bei 1642 cm^{-1} ist von mehreren Gruppen der 4-C=O Valenzschwingung von Q_B zugeordnet worden^{16c-e, 45}. Allerdings kann sie weder von der H-O-H Valenzschwingung von Wasser noch von der Amid I Bande der α -Helices unterschieden werden. Deswegen kann der Anstieg dieser Bande nicht unbedingt als Zunahme der Menge an Chinon bei Belichtung interpretiert werden. Viel wahrscheinlicher kommt dieser Anstieg durch eine Umorientierung einer der oben genannten Spezies in Bezug auf die Oberfläche zustande. Wie oben bereits erwähnt, besagt die SEIRAS Theorie, dass nur Dipole, die parallel zur Oberflächennormale ausgerichtet sind, bevorzugt verstärkt werden³⁶. Auf der anderen Seite, ist die Interpretation der negativen zeitlichen Entwicklung der 1683 cm^{-1} Bande, die der C=O stretching Schwingung der 9-keto Gruppe von P ^{16e, 46} zugeordnet wurde, konsistent mit der Konzentrationsabnahme von P , könnte aber auch die bloße Umorientierung dieser C=O Gruppe darstellen.

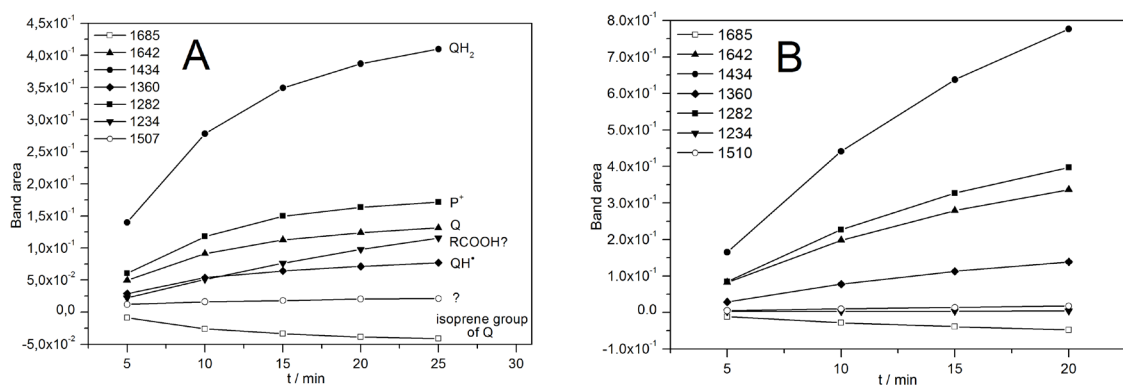


Abbildung 5.7: Absorbanzen der charakteristischen Banden bei kontinuierlicher Beleuchtung von RC in der ptBLM als Funktion der Zeit ohne (A) und mit zugegebenem Q_{10} (B).

Breite positive und negative Banden im 3800-3000 cm^{-1} Bereich wurden von Iwata et al.^{17c} als mit den Q_A^-/Q_A und Q_B^-/Q_B Übergängen verknüpften Wasser Valenzschwingungen interpretiert. Eine Zuordnung für die Bande bei 1507 cm^{-1} konnte in der Literatur nicht gefunden werden. Das gleiche gilt für die Bande bei 1234 cm^{-1} . Diese Bande ist allerdings eine prominente und wiederkehrende Bande, die mit keiner Änderung korreliert werden konnte, wie z.B. Zugabe von Q_{10} , Belichtungs- und Relaxationszeit. Sie liegt im Bereich der C-O Valenzschwingung der Carbonsäuren und

könnte somit zur Protonierung irgendeiner COOH Gruppe innerhalb des Proteins zugeordnet werden.

Zusätzlich zu diesen relativ starken Banden, konnten einige weitere kleinere Banden im $1470\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ Bereich erkannt werden, z.B. als Diagonalpeaks eines synchronen 2D Korrelationsspektrums (Abb. 5.8).

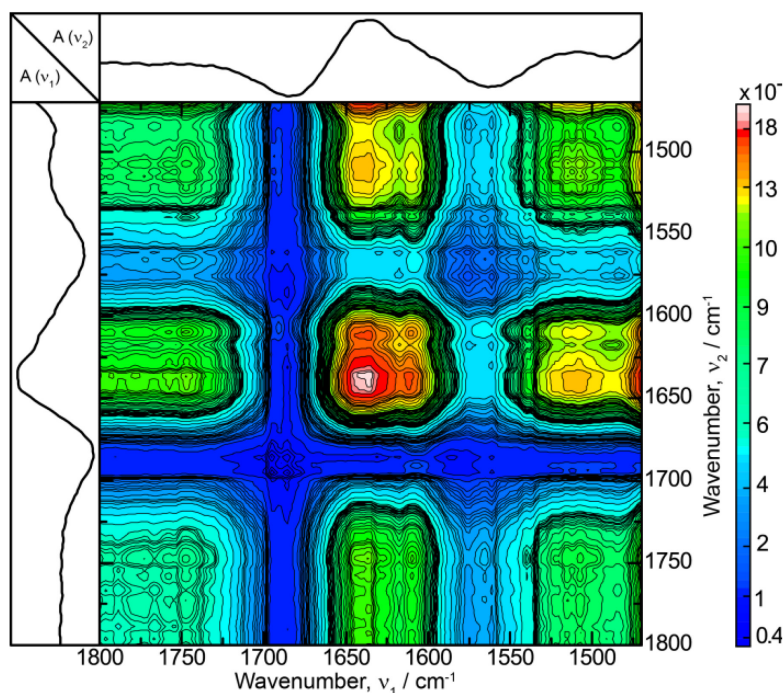


Abbildung 5.8: Synchrones 2D-Korrelationsspektrum der hell minus dunkel Spektren aus Abb. 5.6B von RC in der ptBLM im Wellenzahlbereich $1470\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$. Die zugehörigen 1D Spektren sind über dem 2D-Spektrum aufgezeichnet. Banden bei 1489 , 1611 und 1746 cm^{-1} sind als Diagonalpeaks zu erkennen. Der Korrelationsparameter des 2D-Spektrums ist der Belichtungszeit des Systems (hell minus dunkel), analog zum 1D Spektrum aus Abb. 5.6B

Die Auftragung des IR Spektrums entlang der zweiten Dimension (2D correlation spectroscopy), führt zu einer besseren Bandenauflösung als im zugehörigen 1D Spektrum⁴⁷. Deswegen können jetzt auch kleinere Banden erkannt werden, wie z.B. die Bande bei 1489 cm^{-1} , die dem Semichinon, das im Prozess der Q_B^- Bildung entsteht, zugeordnet wird^{16c, 16e, f, 43}. Die Bande bei 1611 cm^{-1} ist der C=C Valenzschwingung des Chinonrings zugeordnet worden¹⁵ und die Bande bei 1746 cm^{-1} ist bezüglich der Protonierung des Asp-L-210 in der Literatur diskutiert worden^{16g, 45a}. Die Zuordnung der Banden ist in der Tabelle 5.3 zusammengefasst.

Tabelle 5.3: Bandenzuordnung der Markerbanden von RC rekonstituiert in der ptBLM bei kontinuierlicher Belichtung

Bande [cm^{-1}]		Zuordnung	
Experimentell	Literatur	Molekül	Vibrationsmode
1234	1232 ⁴⁸	Carbonsäure	C-O stretch
1268	1264 ¹⁵	Q	C ₃ -O-CH ₃
1282	1282 ^{16c, 43}	P ⁺	
1293	1288 ¹⁵	Q ₁₀ (isoliert)	C ₂ -O-CH ₃
1360	1365 ^{44b, c} , 1355 ^{16c, 44a}		Q _A ⁻ Q _B /Q _A Q _B ⁻
1389	1392 ^{16d} , 1388 ^{15, 16b}	QH ₂	
1434	1433 ^{15, 16b, 16e, f}	Q _B H ₂	
1435	1438 ^{16d} , 1439 ^{45a}	Semichinon	
1484	1479 ^{16e, f, 43}	Semichinon	Q _A ⁻ Q _B /Q _A Q _B ⁻
1494	1491 ¹⁵	QH ₂	
1544	1550 ^{16d, 48}	Amid II	
1561	1556 ^{16e}	Trp	
1606	1601 ⁴⁹		C ₄ =O
1610	1611 ¹⁵		C=C stretch ring
1636	1634 ^{16e, 46, 49}	Acetyl C=O von P _L	C ₄ =O, C ₄ =O(Q _A)
1642	1640 ^{16d, 43} , 1641 ^{16c, 45} , 1642 ^{16e}	Chinon Q _B	1-,4-C=O stretch
1685	1682 ⁴⁶ , 1683 ^{16e}	9-keto Gruppe von P	C=O
1746	1751 ^{16f, g}	Protonierung von Asp210	
3400	3485 ^{17c}	H ₂ O	Q _B ⁻ /Q _B
3629	3632 ^{17c}	H ₂ O	Q _B ⁻ /Q _B

Um die oben besprochene Bandenzuordnung zu bestätigen, wurden Spektren als Funktion der Zeit, bei kontinuierlicher Belichtung, auch mit zusätzlich in die ptBLM ko-rekonstituierten fettlöslichen Q₁₀, aufgenommen. Die Absorbanz der starken Banden nimmt wie vorher bei Belichtung zu und während der Relaxation ab. Die Absorbanzen sind jedoch in Gegenwart des ko-rekonstituierten Q₁₀ insgesamt größer (Abb. 5.7). Da diese Messungen bei kontinuierlicher Belichtung durchgeführt worden waren, ist die zeitliche Entwicklung dieser Banden nicht mit anderen zeitlich aufgelösten FTIR Messungen vergleichbar, denn die Absorbanzen sind auch stark von Temperatureffekten sowie die Diffusion der Chinonspezies in die Lipidphase beeinflusst. Allerdings wurden diese Messungen durchgeführt um zu bestätigen, dass die Banden durch den Chinon/Hydrochinon Pool zustande kommen.

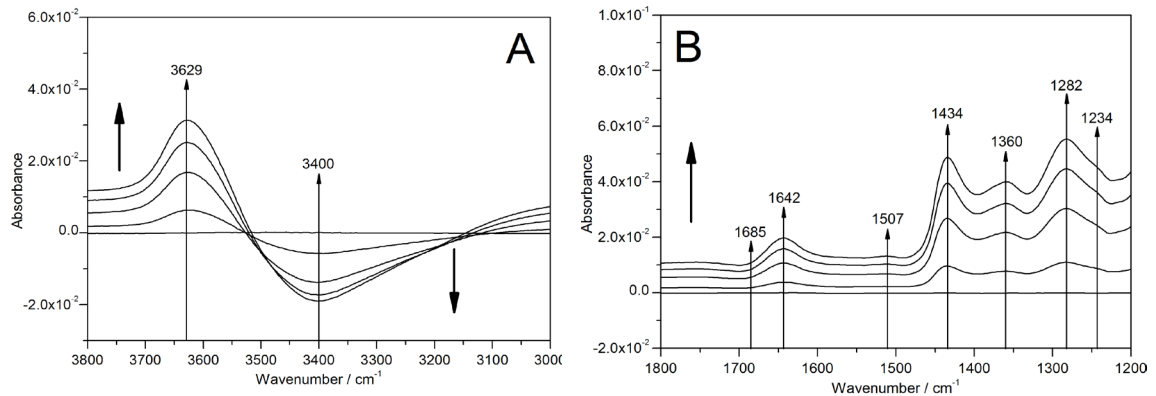


Abbildung 5.9: Hell minus dunkel Spektren von RC in der ptBLM mit ko-rekonstituiertem Q10 mit dem Spektrum im Dunklen als Referenz im oberen (A) und unteren (B) Wellenzahlbereich. Differenzspektren wurden alle 5 min. aufgenommen.

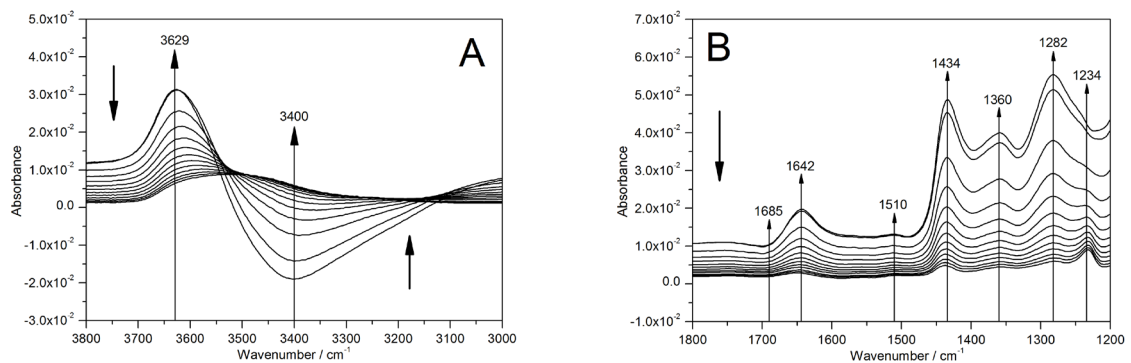


Abbildung 5.10: Relaxation der Banden von RC in der ptBLM mit ko-rekonstituiertem Q10 nach Belichtung in oberen (A) und unteren (B) Wellenzahlbereich. Die Relaxationsdauer war 1 h, Differenzspektren wurden alle 5 min. aufgenommen.

Eine andere Charakteristik der gezeigten Spektren ist die Bandenhalbwertsbreite, die wesentlich größer ist als die in der Literatur gefundenen scharfen Banden, die unter Verwendung von Redoxmediatoren erhalten wurden. Der gleiche Effekt wurde bereits in früheren Arbeiten über SEIRAS-Messungen an Cytochrom *c* Oxidase beobachtet, die mit und ohne Verwendung von Mediatoren durchgeführt wurden^{42b, 50}. Die Halbwertsbreite ist in der Infrarotspektroskopie mit den Freiheitsgraden des betrachteten Moleküls in Bezug auf dessen Umgebung verknüpft⁵¹. Die Ladungstrennung im RC ruft Redoxübergänge der prosthetischen Gruppen hervor, die meistens mit Konformationsänderungen der Sekundärstruktur des Proteins oder anderen

z.B. Änderungen in den Wasserstoffbrückenbindungen zusammenhängen. Mediatoren wechselwirken ebenso mit diesen Redoxübergängen, sodass diese Konformationsänderungen bzw. andere Wechselwirkungen mit den Proteinstrukturen unterdrückt werden könnten.

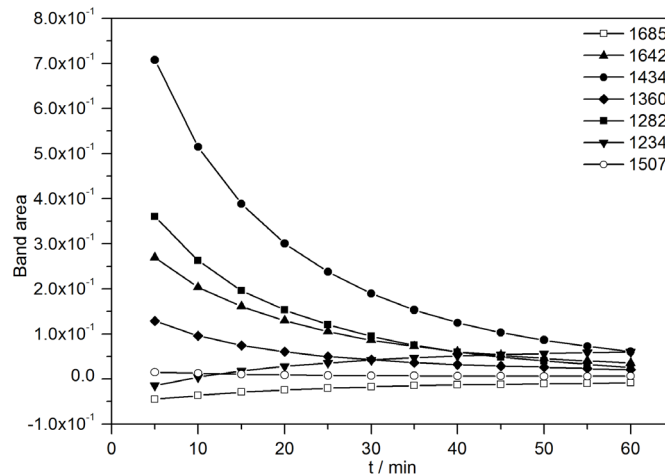


Abbildung 5.11: Kinetik der charakteristischen Banden während Relaxation. Alle Bandenflächen nehmen so wie erwartet ab, während die Bande bei 1234 cm^{-1} zunimmt.

Bewegungsfreiheit kann auch durch zu hohe Packungsdichte der Proteine eingeschränkt werden, was sogar die gesamte Aktivität des Enzyms verhindern kann^{18b}. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass das Protein eine gewisse Flexibilität innerhalb der Lipiddoppelschicht benötigt. Diese Flexibilität kann eingeschränkt werden wenn das Protein in Liposomen inkorporiert und auf CaF_2 Fenster des FTIR Spektrometers angetrocknet und rehydriert wird⁵². Die gleiche Erklärung könnte auch bei Luft getrockneten und rehydrierten Chromatophoren gelten⁵³. Somit können die relativ großen Halbwertsbreiten in diesen Spektren auf Grund der ungestörten Wechselwirkung der Elektronentransferreaktionen zwischen den Kofaktoren mit den umliegenden Proteinstrukturen erklärt werden.

Ein anderer Sachverhalt sind die langdauernden Reaktionen nach Belichtung, trotz der kurzen Rekombinationszeit des RC. Eine Erklärung hierfür könnte die verlängerte Rekombinationsrate (in Größenordnung von Minuten) des Semichinons sein, die bei in ihren natürlichen Membranen (Chromatophoren) eingebetteten RCs gefunden wurde⁵⁴. Diese Beobachtung ist von wesentlicher Bedeutung, da in der vorliegenden Arbeit im Gegenteil vieler anderen Studien keine Reduktionsmittel verwendet wurden, die das

spezielle Paar wieder in den Grundzustand zurückbringt. So kann die Ladungstrennung bis zum Niveau von Q_B^- verlaufen. Eine gewisse Rekombination müsste stattfinden, die P wiederherstellt. Sonst könnte in den Messungen dieser Arbeit kein QH_2 beobachtet werden, da ein zweites Elektron von Q_B^- aufgenommen werden muss um Q_B^{2-} zu bilden. Die langdauernde Reaktion stimmt besonders mit der Diffusionsmöglichkeit des Q_B und Q_BH_2 zwischen der Lipid- und Proteinphase, sowie mit der Wiederherstellung von Q_A beim $Q_A^-Q_B/Q_AQ_B^-$ Übergang überein. Eine nachfolgende Ladungstrennung kann nur dann erfolgen wenn beide Komponenten P und Q_A zum Grundzustand zurück gebracht werden. Diese Schlussfolgerung wird vom Auftreten der starken Wasserbanden im OH Bandenbereich, die während der $Q_A^-Q_A$ und $Q_B^-Q_B$ Übergänge entstehen gestützt (siehe unten). Eine weitere Bestätigung für diese Annahme ist die Tatsache, dass sich die Absorbanzen, die bei Belichtung größer werden, bei der Relaxation vollständig reversibel zurück bilden (Abb. 5.10 und 5.11).

Die positiven und negativen Banden im $3800-3000\text{ cm}^{-1}$ Bereich stammen von den Wassermolekülen^{17c}, die bekanntlich ein starkes Übergangsdipolmoment besitzen. Das macht die hohe Empfindlichkeit dieser Banden aus. Die Schwingungskomponenten, die von der Sekundärstruktur des Proteins stammen, wie z.B. die Protonierung der Asp-L-210 sind dagegen schwach. Erwähnenswert in diesem Kontext ist der isosbestische Punkt der Banden im $3800-3000\text{ cm}^{-1}$ Bereich, der darauf hindeutet, dass nur *zwei* Spezies dessen Konzentration variiert zur Absorption beitragen. Der isosbestische Punkt ist ferner ein Zeichen dafür, dass die Temperatureffekte klein sind, was ein weiteres Zeichen dafür ist, dass die langdauernde Reaktion zum großen Teil durch Diffusion bestimmt ist.

5.2.2 SEIRAS von RC korekonstituiert mit dem bc_1 -Komplex in der ptBLM

Ko-immobilisierung des RC mit dem bc_1 -Komplex auf der two-layer Goldoberfläche

Die Ko-immobilisierung des RC und des bc_1 -Komplexes über an der P Seite bzw. dem C-Terminus der Cyt *b* Untereinheit angebrachten His-Tags wurde in Abhängigkeit der Anbindungszeit aufgenommen (Abb. 5.12). Vibrationskomponenten im Amid I und Amid II Bereich bei 1657, 1647 bzw. 1593 cm^{-1} nehmen mit der Adsorptionszeit zu, während zwei Banden bei 1456 und 1435 cm^{-1} abnehmen. Die Bande bei 1435 cm^{-1} ist die Markerbande für QH_2 ^{16e, 44}. Da die Adsorption nicht unter Lichtabschirmung durchgeführt worden war, scheint etwas QH_2 im RC sich gebildet zu haben, das vom bc_1 -Komplex während der Ko-immobilisierung konsumiert wurde. Die Bande bei 1456 cm^{-1} konnte keiner bekannten Komponente zugeordnet werden.

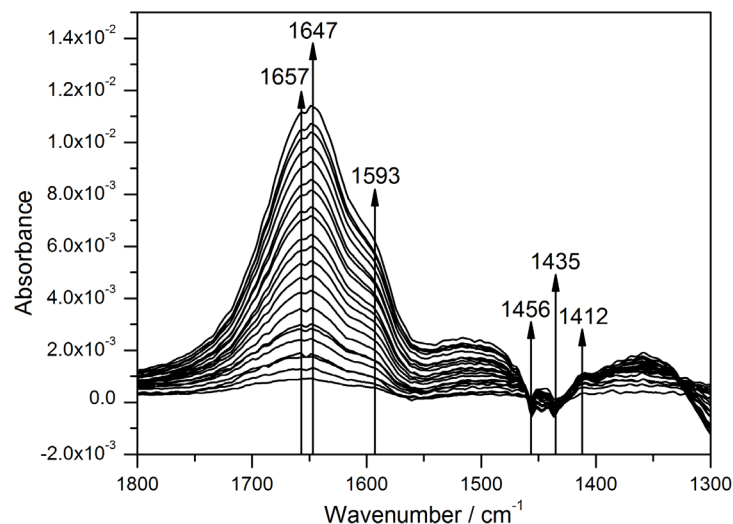


Abbildung 5.12: SEIRA Spektren der Ko-immobilisierung des RC mit dem bc_1 -Komplex auf der Goldoberfläche als Funktion der Zeit. Adsorptionszeit beträgt 4 h. Zeitintervalle zwischen den Aufnahmen sind 10 min.

Interaktion der zwei Proteine

Hell minus dunkel Spektren wurden aufgenommen und Absorbanzspektren wurden mit dem jeweiligen im Dunkeln aufgenommenen Spektrum als Referenz berechnet. Spektren vom bc_1 -Komplex ko-rekonstituiert mit dem RC sind in Abb. 5.13 im Vergleich zu zugehörigen Spektren von RC allein aufgezeichnet.

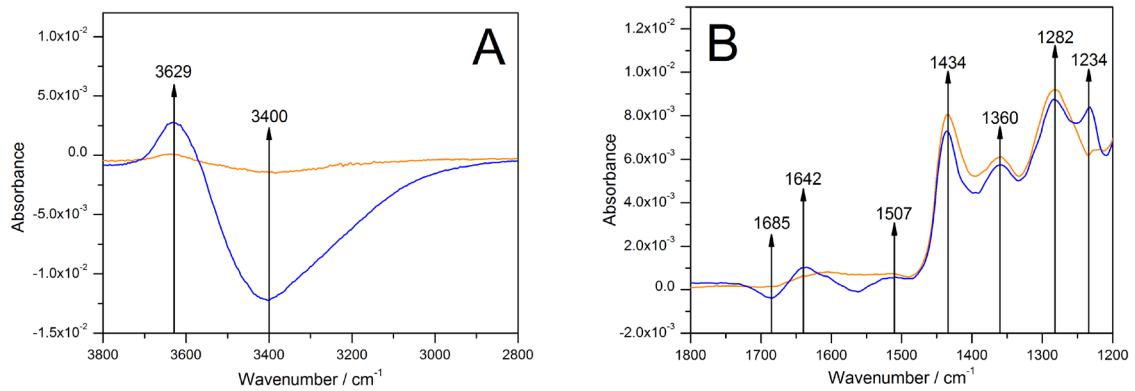


Abbildung 5.13: Steady-state hell minus dunkel Spektren von nur RC (blau) und rekonstituiert mit dem bc_1 -Komplex (orange) in der ptBLM im oberen (A) und unteren (B) Wellenzahlbereich.

Im Spektrum mit dem bc_1 -Komplex sind die Absorbanzen der Banden bei 1282, 1360, 1434 cm^{-1} fast unverändert, während die Banden bei 1234, 1507, 1642 und die negative Bande bei 1685 cm^{-1} sind wesentlich kleiner geworden. Auch die breite negative und positive Banden bei 3400 und 3629 cm^{-1} zeigen eine kleinere Absorbanz im Vergleich zum RC allein. Die negative Bande bei 1685 cm^{-1} weist die Abnahme des speziellen Paares P nach^{16e, 46} und die Bande bei 1642 cm^{-1} ist eine Mischung von Amid I, Wasser und einer Markerbande für Q_B ^{16c-e, 43, 45}. Die Bande bei 1234 cm^{-1} ist eine prominente Bande, die auch im Falle ohne den bc_1 -Komplex wiederkehrt, die zu keiner Art von Änderung korreliert werden konnte (s. 5.2.1). Sie liegt im Bereich der C-O Valenzschwingung von Carbonsäuren⁴⁸ und könnte somit der Protonierung irgendeiner COOH Gruppe innerhalb des Proteins zugeordnet werden. Die Bande bei 1507 cm^{-1} konnte nicht zugeordnet werden (die nächste in der Literatur gefundene Bande bei 1516-18 cm^{-1} ist Tyr-OH zugeordnet). Die Banden bei 1282, 1360, 1434 cm^{-1} wurden der P^+ Spezies des speziellen Paares^{16c, 43} bzw. einem Semichinon während der $Q_B^{-16c, 44}$ bzw. QH_2 ^{16e, 44} Bildung zugeordnet, die während der Lichtanregung des RC unabhängig der Anwesenheit des bc_1 -Komplexes gebildet zu werden scheinen. Die breiten positiven und negativen Banden bei 3400 und 3629 cm^{-1} sind von Iwata et al.^{17c} Wasser Valenzschwingungen in Bezug auf die Q_A^-/Q_A sowie Q_B^-/Q_B Übergänge im RC zugeordnet worden. Die Abnahme dieser Banden betrachtet zusammen mit der Abnahme der 1642/1685 cm^{-1} Banden weist bereits darauf hin, dass es eine Interaktion

dieser Spezies mit dem bc_1 -Komplex geben könnte, obwohl die Interaktion eher auf dem Niveau der Semichinon/Chinon statt den Hydrochinon Spezies, sowie man erwarten würde, ist. Der dominante Effekt des bc_1 -Komplexes ist die beträchtliche Abnahme der Wasserbanden im $3800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ Bereich, die mit den Q_A^-/Q_A und Q_B^-/Q_B Übergängen im RC verknüpft sind. Diese Spezies sowie die darin enthaltenen Wassermoleküle sollten die Bindungstasche des RC nicht verlassen können. Deswegen wird angenommen, dass die Interaktion zwischen dem lichtaktivierten RC und dem bc_1 -Komplex in Abwesenheit eines Elektronendonators nur eine sterische Hinderung der beiden Proteine statt einer chemischen Reaktion ist.

Als nächstes wurde zusätzliches fettlösliches Q_{10} gemeinsam mit den zwei Proteinen ko-rekonstituiert. Ein Anstieg aller Banden ist zu sehen, was die Zuordnung der Chinon Spezies bestätigt (Abb. 5.14).

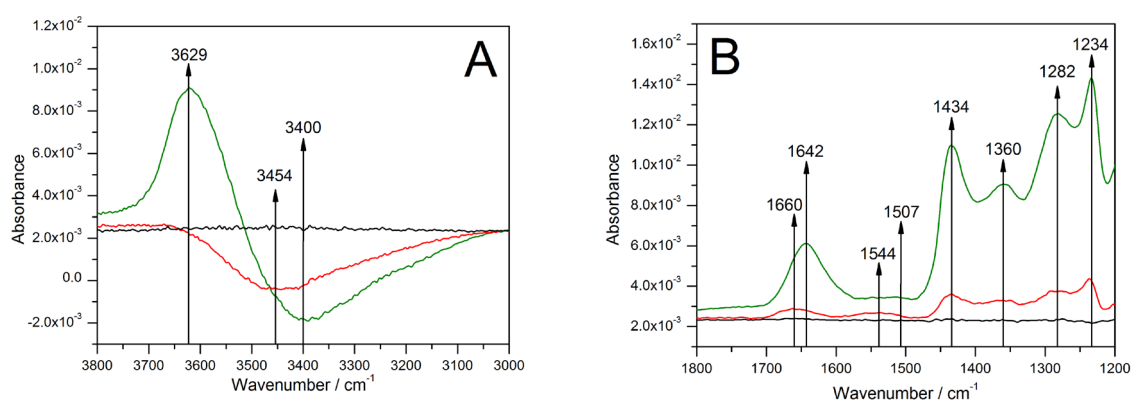


Abbildung 5.14: Steady-state hell minus dunkel Spektren von RC ko-rekonstituiert mit dem bc_1 -Komplex und zugegebenem Q_{10} in der ptBLM vor (grün) und nach Zugabe von Cytochrom c (rot) im oberen (A) und unteren (B) Wellenzahlbereich. Das Referenzspektrum (schwarz) wurde im Dunklen vor Belichtung aufgenommen.

Die prominenteste Veränderung ist die Zunahme des positiven/negativen Bandenpaares bei 3400 und 3629 cm^{-1} im Bereich der Valenzschwingung von Wasser^{17c}. Zusätzliche Banden bei 2852 , 2922 , 2958 cm^{-1} wurden beobachtet, die vor der Ko-rekonstitution zusätzliches Q_{10} nicht zu sehen waren (Daten nicht gezeigt). Diese könnten von den CH Valenzschwingungen, wahrscheinlich vom Kohlenwasserstoffrest des Q_{10} , stammen. Der nach der ersten Belichtung erhaltene Steady-State wurde dann zur Relaxation im Dunkeln belassen. Die Absorbanzen aller Banden nahmen ab, was an Beispiel einiger Banden in Abb. 5.15 dargestellt ist, wobei die Absorbanzen in Abhängigkeit der

Relaxationszeit aufgetragen sind. Die restliche Banden zeigen ein ähnliches Verhalten, allerdings in einer anderen Größenordnung (Daten nicht gezeigt).

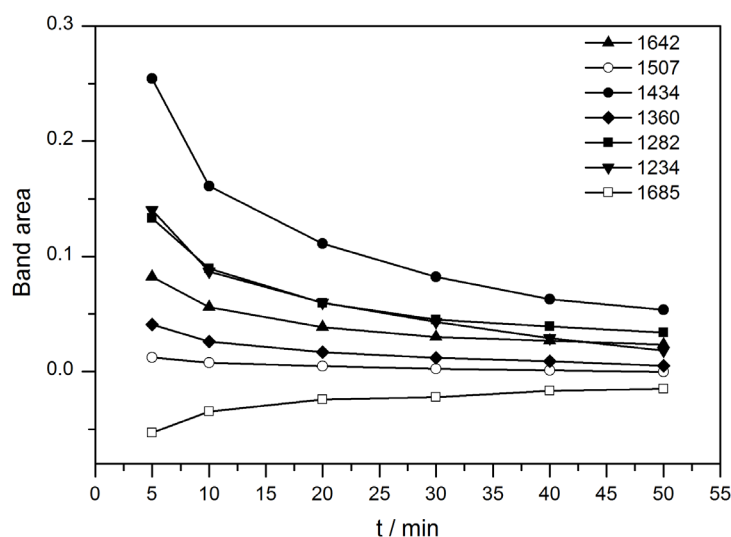


Abbildung 5.15: Kinetik der charakteristischen Banden während Relaxation. Alle Banden nehmen gleichmäßig ab, während die Bande bei 1234 cm^{-1} ein verschiedenes Relaxationsverhalten zeigt.

Letztlich wurden hell minus dunkel Absorbanzspektren nicht nur mit zusätzlichem Q_{10} sondern auch mit in die wässrige Phase zugegebenem (oxidierten) Cytochrom *c* (*cc*) aufgenommen (Abb. 5.14). Dies führte zu einer beträchtlichen Abnahme aller oben beschriebenen Banden. Diese Abnahme deutet auf eine wesentliche Interaktion zwischen dem lichtaktivierten RC und dem bc_1 -Komplex, aber nur wenn die durch QH_2 zum bc_1 -Komplex gelieferte Elektronen zur Reduktion des *cc* verwendet werden. Dies ist konsistent mit der Abnahme der 1434 cm^{-1} Bande, die QH_2 zugeordnet wurde. Die Abnahme der Bande bei 1282 cm^{-1} kann auf der anderen Seite nur dadurch begründet werden, dass P^+ vom Semichinon reduziert wird, das an der Q_i Stelle des bc_1 -Komplexes gebildet wird. Diese Annahme ist konsistent mit der Tatsache, dass reduziertes *cc* die Lipiddoppelschicht nicht durchdringen kann, während sich die Chinon Spezies in der Lipidphase bewegen können. Weitere Begründung hierfür ist die Abnahme, sowohl der Bande bei 1360 cm^{-1} , als auch das Verschwinden der Banden bei 3440 und 3629 cm^{-1} , die Semichinon bzw. Wasser Banden auf Grund der Semichinonbildung zugeordnet werden (Abb. 5.14). In diesem Kontext ist es wichtig zu vermerken, dass Semichinon Spezies, die an der Q_A und Q_B Stelle gebildet werden nicht

mit dem P^+ interagieren, was an den Banden bei 1360 und 1282 cm^{-1} zu erkennen ist, die nicht während der Interaktion des RC mit dem bc_1 -Komplex abnehmen.

Bei näherer Betrachtung der letzten hell minus dunkel Absorbanzspektren sind schwache Banden, die auf nach dem Turnover übriggebliebene kleinere Mengen an QH_2 , P^+ und Semichinon hinweisen, zu sehen. Zusätzlich verschwindet die Bande bei 3629 cm^{-1} vollkommen, während die Bande bei 3400 cm^{-1} zu 3454 cm^{-1} verschoben ist. Diese Effekte deuten auf beträchtliche Umordnung der Wassermoleküle, die mit den Q_A^-/Q_A und Q_B^-/Q_B Übergängen zusammenhängen hin und somit auch auf die Konzentrationsabnahme des Semichinons was in Übereinstimmung mit der Abnahme der 1360 cm^{-1} Bande ist^{17c}. Außerdem ist eine Verschiebung der Bande bei ca. 1642 cm^{-1} aufgetreten um eine Bande bei 1660 cm^{-1} zu bilden, eine Bande die für die Amid I Schwingung charakteristisch ist, und eine Bande bei 1544 cm^{-1} ist erschienen, die im Bereich der Amid II Schwingungen liegt. Diese Banden könnten Änderungen der Proteinstruktur, als Folge der Elektronentransferreaktionen, zugeordnet werden. Die Bandenzuordnung ist in der Tabelle 5.3 zusammengefasst.

Auf Grund der Position der His-Tags sind die zwei Proteine so auf der Oberfläche des ATR Kristalls angeordnet, dass das RC und der bc_1 -Komplex jeweils mit dem speziellen Paar bzw. dem C-Terminus der Cyt *b* Untereinheit zur Goldoberfläche orientiert sind (Abb. 3.10). Dies bedeutet, dass ihre Orientierung zueinander verschieden ist von derjenigen in der Membran photosynthetischer Bakterien. Dort befindet sich *cc* auf der gleichen Seite der Membran und kann daher in einem zyklischen Prozess zwischen dem Rieskezentrum des bc_1 -Komplexes und dem P^+ des RC reduziert und wieder oxidiert werden (Abb. 3.8). D.h. das *cc* pendelt in der wässrigen Phase zwischen den beiden Komplexen. Leider konnte diese Konfiguration in unserem biomimetischen System nicht realisiert werden, da ein bc_1 -Komplex mit dem His-Tag am N-Terminus schwer zu exprimieren ist. Außerdem wird die Interaktion sowieso über die Hydrochinon Spezies in der Lipidphase angenommen. So ist die *cc* Bindungsstelle des bc_1 -Komplexes zur äußeren Seite der Membran hin orientiert. Deswegen kann das *cc*, das in der wässrigen Lösung zugegeben wird, direkt mit dem bc_1 -Komplex reagieren, um die Elektronen vom Rieske Zentrum aufzunehmen. Daraus folgt, dass mit dieser Arbeit die Entstehung und das Verschwinden der bei Lichtanregung gebildeten Spezies beobachtet werden konnte, die beim enzymatischen Turnover des bc_1 -Komplexes verbraucht werden. Die relativ starke Absorbanz der

Markerbanden vor der Zugabe von cc , sowie die relativ große Halbwertsbreite der Banden wurde bereits im vorigen Abschnitt diskutiert.

6. Conclusio und Aussicht

Für SEIRAS ist die hohe Sensitivität für Schwingungskomponenten in unmittelbarer Nähe der Oberfläche charakteristisch, vor allem wenn ihre Übergangsdipolmomente senkrecht zur Oberfläche orientiert sind³⁶. Die Sensitivität nimmt proportional mit der Ausbreitung des elektrischen Feldes in die flüssige Phase ab, die im Kontakt mit der Metallschicht auf dem ATR Kristall ist. Die Proteine sind in einer definierten Orientierung auf der Oberfläche angeordnet, wobei beim RC das spezielle Paar Richtung Oberfläche orientiert ist und beim bc_1 -Komplex die Cytochrom *c* (*cc*) Bindungsstelle sich auf der gegenüberliegenden Seite der Membran, weiter entfernt von der Oberfläche, befindet (Abb. 3.10). Chinon/Hydrochinon Spezies können ungestört in der Lipidphase der Membran diffundieren und können sich somit in einem Abstand ähnlich dem des speziellen Paares zur Oberfläche befinden. Das erklärt die, im Vergleich mit anderen Transmissions FTIR Spektren aus der Literatur, große Absorbanz der Markerbanden der Chinon Spezies und des speziellen Paares bei SEIRA Spektren.

Eine Charakteristik der in dieser Arbeit gemessenen SEIRA Spektren, die sie von den in der Literatur gefundenen Spektren wesentlich unterscheidet, ist die größere Halbwertsbreite der Banden. Der gleiche Effekt wurde früher bei der Cytochrom *c* Oxidase in Abwesenheit von Redoxmediatoren beobachtet^{42b, 50}, während in deren Anwesenheit, die wesentlich kleinere Halbwertsbreite aus der Literatur bestätigt werden konnte. Die Halbwertsbreite hängt allgemein mit der Bewegungsfreiheit der Strukturen innerhalb des Systems⁵¹ zusammen. Mediatoren reagieren unabhängig mit jedem der Kofaktoren und können somit Wechselwirkungen der Proteinstrukturen mit den unter physiologischen Bedingungen auftretenden sequentiellen Redoxübergängen unterdrücken. Andererseits ist bereits gezeigt worden, dass eingeschränkte Bewegungsfreiheit bei zu hoher Packungsdichte der Proteine die Aktivität der Proteine verhindern kann^{18b}. In anderen FTIR Studien werden die Proteine in Liposomen inkorporiert⁵² oder in den natürlichen Chromatophoren⁵³ auf CaF_2 Fenstern des FTIR Spektrometers angetrocknet und rehydriert. Die Abwesenheit einer geordneten Lipiddoppelschicht könnte in diesen Fällen die Bewegungsfreiheit der Proteine beeinträchtigen. Deswegen wird die große Halbwertsbreite der Banden als die ungestörte Bewegungsfreiheit in der Lipiddoppelschicht auf Grund der Interaktion der

Kofaktoren mit den anliegenden Proteinstrukturen interpretiert, und damit als Vorteil des ptBLM-Systems angesehen.

Ein anderer Sachverhalt auf Grund des verwendeten ptBLM-Systems sind die langen Reaktionszeiten nach Belichtung, trotz der sehr kurzen Rekombinationszeit zwischen P^+ und Q_A^- . Eine Erklärung könnte die verlängerte Rekombinationsrate des Semichinons Q_B^- sein, in der Größenordnung von Minuten, die bei in Chromatophoren eingebetteten RCs berichtet worden ist⁵⁴. Diese Beobachtung ist in so fern von großer Bedeutung, als in der vorliegenden Arbeit keine zusätzlichen reduzierenden Komponenten verwendet wurden, wie in den meisten anderen Studien. Damit QH_2 gebildet werden kann, was in dieser Arbeit beobachtet wurde, muss das spezielle Paar zurück zum Grundzustand reduziert werden. Dies könnte mit der Diffusionsmöglichkeit der Q_B und Q_BH_2 zwischen Lipid und Proteinphase, sowie der Wiederherstellung von Q_A beim $Q_A^- Q_B/Q_AQ_B^-$ Übergang (s. 5.2.1) erklärt werden. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass die Absorbanzänderungen bei Belichtung während der Relaxation vollständig reversibel sind.

Weiters konnte die Interaktion des RC mit dem bc_1 -Komplex mit dem angeregten Zustand des speziellen Paares gezeigt werden, trotz der „falschen“ gegenseitigen Orientierung beider Proteine (s. 5.2.2). Es wird angenommen, dass der oxidierte Zustand des speziellen Paares, P^+ , in einer Art Kurzschluss-Reaktion vom Semichinon der Q_i Bindungsstelle des bc_1 -Komplexes zum Grundzustand P, zurück reduziert wird. Dieser Vorgang würde in der „richtigen“ Orientierung durch reduziertes Cytochrom *c* ablaufen. Das ist hier nicht möglich, da Cytochrom *c* die Lipidmembran nicht durchdringen kann.

Somit kann aus dieser Arbeit geschlossen werden, dass das in dieser Arbeit untersuchte biomimetische System zur Untersuchung der genannten Proteine mittels SEIRAS gut geeignet ist und in vielen Aspekten vorteilhaft gegenüber anderen verwendeten Systemen. Allerdings, muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die gewonnenen Erkenntnisse der Bestätigung durch echte zeitlich aufgelöste SEIRAS Messungen bei gepulster Lichtanregung bedürfen.

7. Anhang

A. Probenpräparation

A.1 Präparation ultraflacher Goldoberflächen (TSG)

Die Präparation von ultraflachen template stripped gold (TSG) Obeflächen wurde nach einer Methode, beschrieben von Naumann et al.⁵⁵ durchgeführt. Die Rauigkeit ist als <1 nm angegeben.

Silizium Wafer wurden mittels RCA Lösung ($\text{DH}_2\text{O}:\text{NH}_3:\text{H}_2\text{O}_2 = 5:1:1$) bei 78 °C eine Stunde lang gereinigt und anschließend mit deionisiertem Wasser (DH_2O) und Ethanol gespült. Nach Trocknen im Argonstrom wurde eine 43 nm dicke Goldschicht auf die Wafer elektrothermisch bedampft mit einer Rate von 0,1 nm/s unter Vakuumbedingungen ($p < 2 \cdot 10^{-6}$ mbar). Nach dem Aufdampfprozess wurden die Wafer kurzfristig vor dem Kleben in Argon aufbewahrt. Glasobjektträger wurden für 10 min. jeweils in Aceton, Ethanol, 2% Helmanex-Lösung und deionisiertem Wasser im Ultraschallbad gereinigt und anschließend getrocknet. Sie wurden dann mit einem zweikomponentigen Epoxy-Kleber EPO-TEK 353ND-4 (Brechungsindex $n=1,5922$ @ 633 nm) in einer Presse auf die Goldschicht der Si Wafer geklebt. Der Kleber wurde vor Gebrauch unter Vakuum entgast. Die Träger wurden dann für 90 min. bei 150 °C in den Ofen gestellt, damit der Kleber aushärtet. Nach dem Aushärten können die Träger aufbewahrt werden und unmittelbar vor der Funktionalisierung der Goldoberfläche aufgeklappt (engl.: stripped) werden, um Verunreinigungen zu minimieren.

A.2 Präparation der SPR-Messzelle

Die SPR-Zelle hat ein Volumen von 1 ml und besitzt zwei Fenster mit einer kreisförmigen Fläche von 1 cm², wobei das eine Fenster zum Prisma hin orientiert ist. Durch das zweite Fenster kann der innere Raum der Zelle belichtet werden (Abb. 7.1). Das Fenster zum Prisma trägt auch die Goldoberfläche, auf der die Proteine immobilisiert werden. Die Goldoberfläche dient gleichzeitig als Arbeitselektrode der Dreielektrodenanordnung. Die Gegen- und Referenzelektrode tauchen in die Pufferlösung.

Der Laserstrahl wird mit einem mechanischen Chopper rechteckmoduliert. Mit dem ersten Polarisator wird das Laserlicht parallel polarisiert und mit dem zweiten Polarisator kann die Intensität des einfallenden Laserstrahls eingestellt werden. Der Laserstrahl wird in das Prisma eingekoppelt und innerhalb des Fensters an der Goldoberfläche reflektiert. Die Probe und Detektor sind auf einem Goniometer montiert, womit der Einfallswinkel variiert werden kann. Nach der Reflexion des Strahls wird seine Intensität mit einem Detektor gemessen.

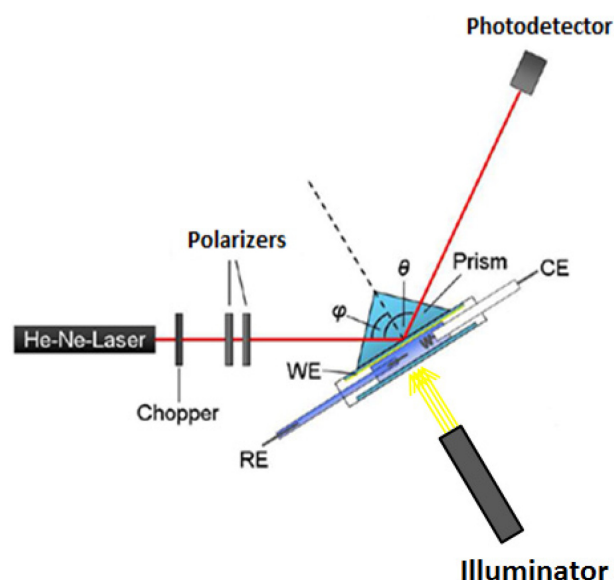


Abbildung 7.1: Schematische Darstellung des SPR-Messaufbaus und Zusammensetzung der SPR-Zelle.

Quelle: ³ (bearbeitet)

A.3 Präparation des ATR-Kristalls

Die Präparation der two-layer Goldoberfläche wurde nach der von Nowak et al.³⁸ beschriebenen Methode durchgeführt. Ein poliertes ATR-Kristall wurde für 60 min. in eine 10 % ethanolische MPTES Lösung getaucht, um einen Anker für die Goldschicht zu bilden. Nach Spülen mit Ethanol, wurde das Kristall mit Argon getrocknet und für 60 min. bei 100 °C angelassen. Das Kristall wurde bei Raumtemperatur zum Abkühlen gebracht, dann für 10 min. in Wasser getaucht und anschließend mit Argon getrocknet. Eine 25 nm Goldschicht wurde mittels elektrothermischer Bedampfung auf das Kristall aufgedampft. Die Goldnanopartikel wurden auf der Goldschicht aufgewachsen, in dem das Kristall in 50 ml wässriger Hydroxylamin Hydrochlorid (0.4 mM) Lösung eingetaucht wurde, zu der 500 µl einer 0.3 mM wässrigen Gold(III) Chlorid Hydrat Lösung 5 Mal in 2 min. Intervallen zugegeben wurde. Letztlich wurde das Kristall mit Wasser gespült und mit Argon getrocknet.

Die Immobilisierung der Proteine sowohl auf der TSG-Oberfläche als auch auf dem ATR Kristall wurde nach der von Nowak et al.^{42b} beschriebenen Methode durchgeführt. Die Goldoberfläche wurde in eine Lösung von 2,5 mM DTNTA und 7.5 mM DTP im trockenen DMSO für 20 h getaucht. Nach Spülen mit Ethanol und deionisiertem Wasser (DH₂O) wurde die Oberfläche für 30 min. in 40 mM NiCl₂ im Acetatpuffer (50 mM, pH=5.5) getaucht und anschließend mit DH₂O gespült um überschussiges NiCl₂ zu entfernen. Die Oberfläche wurde vor dem Einbauen in die Messzelle mit Argon getrocknet und vor dem Beginn der SEIRAS-Messungen mit DDM-PBS Puffer rehydriert. SEIRA Spektren wurden aufgenommen während der Immobilisierung der in DDM-PBS gelösten Proteine auf der NTA-funktionalisierten Goldoberfläche bei einer Endkonzentration von 100 nM (s. 5.2.1 und 5.2.2). Nach 4 h Adsorptionszeit bei 28 °C, wurde die Zelle mit DDM-PBS gespült um unspezifisch adsorbierte und bulk Proteine zu entfernen. Dann wurde die DDM-PBS Lösung mit einer DiPhyPC/DDM-PBS Lösung ausgetauscht. Für die Messungen mit zusätzlichem Coenzym Q₁₀, wurde das Chinon gemeinsam mit DiPhyPC (6 µM Q₁₀ in DiPhyPC/DDM-PBS) gelöst. In beiden Fällen wurde das DDM, mittels Zugabe von Bio-beads in die Lipid/Detergens Lösung, entfernt.

Die elektrochemische PTFE-Zelle wurde auf dem trapezförmigen ATR-Kristall montiert, in dem das IR-Licht nur einmal reflektiert wird. Das aus dem FTIR

Spektrometer kommende IR-Licht wurde in das Kristall, bei einem Einfallswinkel von 60° mittels einem Probenhalter, der in Ref.³⁸ beschrieben wurde, eingekoppelt. Alle Spektren wurden mittels parallel polarisiertem Licht gemessen. Die Intensität des totalreflektierten IR-Strahls wurde mit einem mittels Stickstoff gekühlten photovoltaischen Quecksilber Cadmium Tellurid (MCT) Detektor gemessen. IR Messungen wurden unter anaeroben Bedingungen bei 28 °C durchgeführt. Die Probekammer wurde mit trockener, CO₂-freier Luft gespült. FTIR Spektren wurden mit einer Auflösung von 4 cm⁻¹, einer Blackham-Harris 3-Term Apodisation und einem zero filling Faktor 2 aufgenommen. Die Interferogramme wurden im double-sided Modus gemessen und mit dem Power phase correction Modus in Spektren transformiert. Die Spektren wurden mit der Software OPUS 7 und Origin analysiert.

Die Belichtung wurde mit, durch ein optisches Kabel geleitetem, weißem Licht von einer Fiber-Lite DC950 150 W Quartz Halogen Lampe ausgeführt.

B Chemikalien und Lösungen

- 1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DiPhyPC, >99%) - Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)
- 3,3'-dithiodipropionic acid (DTP, 99%) - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
- 3-Mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTES, 95%) – ABCR GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
- Aceton (99,5 %) - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
- Ammoniak (NH₃, 28 %) - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
- Argon 4.8 – Lidne Gas GmbH (Stadl-Paura, Österreich)
- Bio-beads (20-50 mesh) – Bio-Rad Laboratories GmbH (Wien, Österreich)
- Coenzyme Q₁₀ - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
- D-(+)-glucose (C₆H₁₂O₆, ≥99.5%) - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
- Deionisiertes Wasser (DH₂O, 18 MΩ) - Sartorius-Stedim System (Göttingen, Deutschland)
- Dikaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄) – Fluka (St. Louis, USA)
- dimethyl sulfoxide (DMSO, puriss., dried over molecular sieve) - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
- Dithiobis (nitriloacetic acid butylamidyl propionate) (DTNTA, ≥95.0%) - Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan)
- dodecyl-β-D-maltoside (DDM, ≥98%) - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
- Ethanol (absolut, 99,8 %) – VWR (Darmstadt, Deutschland)
- Glucose oxidase (GOx) und catalase - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
- Gold granules (99,99%) – Mateck GmbH (Juelich, Deutschland)
- Gold(III) chloride hydrate (HAuCl₄·xH₂O, 99.999%) - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
- Hydroxylamine hydrochloride (NH₂OH·HCl, 99%) - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
- Kaliumchlorid (KCl, 99 %) - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
- Nickel(II) chloride (NiCl₂, 98%) - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

- Salzsäure (HCl, 37 %) – VWR (Darmstadt, Deutschland)
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂, 35 %) – Riedel-de Haen (St. Louis, USA)

Alle Chemikalien wurden unverändert verwendet.

Herstellung von Puffer und Lösungen

DTNTA-DTP Lösung: Stammlösungen mit jeweils 10 mM DTNTA bzw. DTP in DMSO im gewünschten molaren Verhältnis bei Raumtemperatur gemischt.

PBS-Puffer: 0,05 M K₂HPO₄ und 0,1 M KCl in DH₂O angesetzt und mit 37 % HCl auf pH=8 titriert. Anschließend bei 121 °C für 20 min. autoklaviert. Bei 4 °C aufbewahrt.

DDM-PBS-Puffer: 2 mM DDM in PBS-Puffer angesetzt. Bei 4 °C aufbewahrt.

DiPhyPC-Lösung: 12 µM DiPhyPC in DDM-PBS angesetzt. Bei 4 °C aufbewahrt.

NiCl₂-Lösung: 40 mM NiCl₂·6H₂O in einer 0,3 (v/v) Acetat-Lösung und mit KOH auf pH=5,5 titriert.

C Messinstrumente

- Analysenwaage ABT120-5DM – Kern (Balingen-Frommern, Deutschland)
- Autoklav – UniEquip (Planegg, Deutschland)
- Bedampfungsanlage FL 400 – HHV (Bangalore, Indien)
- Chopper 197 – EG&G (Las Vegas, USA)
- Epoxid-Klebstoff EPO-TEK – Polytec (Waldbronn, Deutschland)
- Fiber-Lite DC950 illumination (150 W quartz halogen lamp) – Dolan Jenner (Boxborough, MA)
- FTIR Spektrometer Vertex 70v – Bruker Optics (Ettlingen, Deutschland)
- Goniometer – Huber (Rimsting, Deutschland)
- He-Ne Laser 10 mW (632,8 nm) – Uniphase (Milpitas, CA)
- Lock-In Verstärker 5210 - EG&G (Las Vegas, USA)
- pH-Meter Seven Multi – Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
- Potentiostat/Galvanostat μ Autolab Type III – Eco Chemie (Utrecht, Niederlande)
- Prisma LaSFN9 (n=1,85 @ 632,8 nm) – Helma Optics (Jena, Deutschland)
- Ultraschallbad S180H Elmasonic – Elma (Singen, Deutschland)
- Vakuumofen Heraeus – Thermo Scientific (Waltham, USA)
- Vortex-Gerät Vortex Genie 2 Digital – Scientific Industries (Bohemia, USA)

D Verwendete Proteine

Wild-type RCs aus *Rhodobacter sphaeroides* mit einem genetisch am C-Terminus der M-Untereinheit angebrachten 7-His-Tag wurden von einem Stamm von S. G. Boxer (Stanford University, CA) exprimiert⁵⁶ und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das RC wurde nach einer modifizierten Methode von Kirmaier et al.⁵⁷ aufgereinigt.

Der bc_1 -Komplex mit einem His-Tag am C-Terminus der Cytochrom *b* Untereinheit wurde nach Crofts et al.⁵⁸ exprimiert und aufgereinigt.

E Curriculum Vitae

Vedran Nedelkovski

Adresse: Engerthstraße 126/21, 1200 Wien, Österreich

Tel.: +43 699 194 63 000

Email: Vedran.Nedelkovski.fl@ait.ac.at

Persönliche Daten:

Geboren am: 12.03.1987, Skopje, Mazedonien

Nationalität: Mazedonien/Kroatien

Akademische Ausbildung:

Aug. 2011 – Aug. 2012: Durchführung der Diplomarbeit am Austrian Institute of Technology – AIT, Wien, Österreich mit Dr. Christoph Nowak und Dr. Renate Naumann

Feb. 2010 – Jun. 2010: Erasmus Austauschprogramm an der Katholieke Universiteit Leuven (KU Leuven), Leuven, Belgien

Oct. 2005 – Jan. 2013: Studium der Physik an der Universität Wien

Publikationen:

Nedelkovski V., Schwaighofer A., Wraight C., Naumann R. L. C., Nowak C. – Marker Bands of Light-Activated Photosynthetic Reaction Centers From *Rhodobacter sphaeroides* by Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy (SEIRAS), *to be submitted*

Nedelkovski V., Schwaighofer A., Wraight C., Crofts A., Nowak C., Naumann R. L. C. - Co-Reconstitution of Photosynthetic Reaction Centers with the bc_1 complex from *Rhodobacter sphaeroides* studied by Surface-Enhanced Infrared-Absorption Spectroscopy (SEIRAS), *to be submitted*

8. Literaturverzeichnis

„Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.“

1. Buskühl, M. Infrarotellipsometrische Untersuchungen zur oberflächenverstärkten Infrarotabsorption - (SEIRA - Surface Enhanced Infrared Absorption). Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, 2003.
2. Feher, G. A., J. P.; Okamura, M. Y.; Rees, D. C., Structure and function of bacterial photosynthetic reaction centers. *Nature* 1989, 339, 111-116.
3. Kirste, V. U. Elektrochemisch gesteuerte zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie an Redox-Membranproteinen in einer Biomimetischen Membran-Architektur. Dissertation, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz, Germany, 2007.
4. Nowak, C. Spektroelektrochemische Untersuchungen mittels oberflächenverstärkter Infrarotabsorptionsspektroskopie (SEIRAS) an Multi-Redox-Center-Proteinen in einer biomimetischen Membranumgebung. Dissertation, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz, 2010.
5. Salomon, O. Charakterisierung des Ladungstransfers von immobilisiertem Cytochrom c. Dissertation, Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, Aachen, 2006.
6. Cardona, T.; Sedoud, A.; Cox, N.; Rutherford, A. W., Charge separation in Photosystem II: A comparative and evolutionary overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2012, 1817 (1), 26-43.
7. Knoll, W., INTERFACES AND THIN FILMS AS SEEN BY BOUND ELECTROMAGNETIC WAVES. *Annual Review of Physical Chemistry* 1998, 49 (1), 569-638.
8. Scheuring, S.; Lévy, D.; Rigaud, J.-L., Watching the components of photosynthetic bacterial membranes and their in situ organisation by atomic force microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2005, 1712 (2), 109-127.

9. Scheuring, S., AFM studies of the supramolecular assembly of bacterial photosynthetic core-complexes. *Current Opinion in Chemical Biology* 2006, 10 (5), 387-393.
10. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L., *Biochemistry, Fifth Edition*. W.H. Freeman: 2002.
11. Sundström, V., Light in elementary biological reactions. *Progress in Quantum Electronics* 2000, 24 (5), 187-238.
12. (a) Lebedev, N.; Trammell, S. A.; Spano, A.; Lukashev, E.; Griva, I.; Schnur, J., Conductive wiring of immobilized photosynthetic reaction center to electrode by cytochrome c. *Journal of the American Chemical Society* 2006, 128 (37), 12044-12045; (b) den Hollander, M.-J.; Magis, J. G.; Fuchsenberger, P.; Aartsma, T. J.; Jones, M. R.; Frese, R. N., Enhanced Photocurrent Generation by Photosynthetic Bacterial Reaction Centers through Molecular Relays, Light-Harvesting Complexes, and Direct Protein–Gold Interactions. *Langmuir* 2011, 27 (16), 10282-10294.
13. Takshi, A.; Madden, J. D. W.; Mahmoudzadeh, A.; Saer, R.; Beatty, J. T., A Photovoltaic Device Using an Electrolyte Containing Photosynthetic Reaction Centers. *Energies* 2010, 3 (11), 1721-1727.
14. Giess, F.; Friedrich, M. G.; Heberle, J.; Naumann, R. L.; Knoll, W., The protein-tethered lipid bilayer: A novel mimic of the biological membrane. *Biophysical Journal* 2004, 87 (5), 3213-3220.
15. Mezzetti, A.; Leibl, W.; Breton, J.; Navedryk, E., Photoreduction of the quinone pool in the bacterial photosynthetic membrane: identification of infrared marker bands for quinol formation. *FEBS Letters* 2003, 537 (1-3), 161-165.
16. (a) Brudler, R.; Degroot, H. J. M.; Vanliemt, W. B. S.; Gast, P.; Hoff, A. J.; Lugtenburg, J.; Gerwert, K., FTIR SPECTROSCOPY SHOWS WEAK SYMMETRICAL HYDROGEN-BONDING OF THE Q(B) CARBONYL GROUPS IN RHODOBACTER-SPHAEROIDES R26 REACTION CENTERS. *FEBS Letters* 1995, 370 (1-2), 88-92; (b) Mezzetti, A.; Leibl, W., Investigation of ubiquinol formation in isolated photosynthetic reaction centers by rapid-scan Fourier transform IR spectroscopy. *European Biophysics Journal* 2005, 34 (7), 921-936; (c) Breton, J., Steady-state FTIR spectra of the photoreduction of Q(A) and Q(B) in Rhodobacter sphaeroides reaction centers provide evidence against the presence of a proposed transient electron acceptor X between the two quinones. *Biochemistry* 2007, 46 (15), 4459-4465; (d) Breton, J.; Thibodeau, D. L.; Berthomieu, C.; Mantele, W.; Vermeglio,

A.; Navedryk, E., PROBING THE PRIMARY QUINONE ENVIRONMENT IN PHOTOSYNTHETIC BACTERIAL REACTION CENTERS BY LIGHT-INDUCED FTIR DIFFERENCE SPECTROSCOPY. *FEBS Letters* 1991, 278 (2), 257-260; (e) Brudler, R.; Gerwert, K., Step-scan FTIR spectroscopy resolves the Q(A)(-)-Q(B)-> Q(A)Q(B)(-) transition in Rb-sphaeroides R26 reaction centres. *Photosynthesis Research* 1998, 55 (2-3), 261-266; (f) Mezzetti, A.; Blanchet, L.; Juan, A.; Leibl, W.; Ruckebusch, C., Ubiquinol formation in isolated photosynthetic reaction centres monitored by time-resolved differential FTIR in combination with 2D correlation spectroscopy and multivariate curve resolution. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010, 399 (6), 1999-2014; (g) Hermes, S.; Stachnik, J. M.; Onidas, D.; Remy, A.; Hofmann, E.; Gerwert, K., Proton uptake in the reaction center mutant L210DN from Rhodobacter sphaeroides via protonated water molecules. *Biochemistry* 2006, 45 (46), 13741-13749.

17. (a) Breton, J.; Burie, J. R.; Berthomieu, C.; Berger, G.; Navedryk, E., THE BINDING-SITES OF QUINONES IN PHOTOSYNTHETIC BACTERIAL REACTION CENTERS INVESTIGATED BY LIGHT-INDUCED FTIR DIFFERENCE SPECTROSCOPY - ASSIGNMENT OF THE Q(A) VIBRATIONS IN RHODOBACTER-SPHAEROIDES USING O-18-LABELED OR C-13-LABELED UBIQUINONE AND VITAMIN-K-1. *Biochemistry* 1994, 33 (16), 4953-4965; (b) Breton, J.; Berthomieu, C.; Thibodeau, D. L.; Navedryk, E., PROBING THE SECONDARY QUINONE (QB) ENVIRONMENT IN PHOTOSYNTHETIC BACTERIAL REACTION CENTERS BY LIGHT-INDUCED FTIR DIFFERENCE SPECTROSCOPY. *FEBS Letters* 1991, 288 (1-2), 109-113; (c) Iwata, T.; Paddock, M. L.; Okamura, M. Y.; Kandori, H., Identification of FTIR Bands Due to Internal Water Molecules around the Quinone Binding Sites in the Reaction Center from Rhodobacter sphaeroides. *Biochemistry* 2009, 48 (6), 1220-1229.

18. (a) Ataka, K.; Giess, F.; Knoll, W.; Naumann, R.; Haber-Pohlmeier, S.; Richter, B.; Heberle, J., Oriented attachment and membrane reconstitution of his-tagged cytochrome c oxidase to a gold electrode: In situ monitoring by surface-enhanced infrared absorption spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 2004, 126 (49), 16199-16206; (b) Friedrich, M. G.; Kirste, V. U.; Zhu, J.; Gennis, R. B.; Knoll, W.; Naumann, R. L. C., Activity of Membrane Proteins Immobilized on Surfaces as a Function of Packing Density. *The Journal of Physical Chemistry B* 2008, 112 (10), 3193-3201.

19. Jiang, X.; Zaitseva, E.; Schmidt, M.; Siebert, F.; Engelhard, M.; Schlesinger, R.; Ataka, K.; Vogel, R.; Heberle, J., Resolving voltage-dependent structural changes of a membrane photoreceptor by surface-enhanced IR difference spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008, *105* (34), 12113-12117.
20. (a) Trammell, S. A.; Wang, L.; Zullo, J. M.; Shashidhar, R.; Lebedev, N., Orientated binding of photosynthetic reaction centers on gold using Ni²⁺-NTA self-assembled monolayers. *Biosensors and Bioelectronics* 2004, *19* (12), 1649-1655; (b) Trammell, S. A.; Griva, I.; Spano, A.; Tsoi, S.; Tender, L. M.; Schnur, J.; Lebedev, N., Effects of distance and driving force on photoinduced electron transfer between photosynthetic reaction centers and gold electrodes. *Journal of Physical Chemistry C* 2007, *111* (45), 17122-17130; (c) Lebedev, N.; Trammell, S. A.; Tsoi, S.; Spano, A.; Kim, J. H.; Xu, J.; Twigg, M. E.; Schnur, J. M., Increasing efficiency of photoelectronic conversion by encapsulation of photosynthetic reaction center proteins in arrayed carbon nanotube electrode. *Langmuir* 2008, *24* (16), 8871-8876.
21. Shinkarev, V. P.; Ugulava, N. B.; Takahashi, E.; Crofts, A. R.; Wraight, C. A., Aspartate-187 of Cytochrome b Is Not Needed for DCCD Inhibition of Ubiquinol: Cytochrome c Oxidoreductase in Rhodobacter sphaeroides Chromatophores†. *Biochemistry* 2000, *39* (46), 14232-14237.
22. Shinkarev, V. P.; Crofts, A. R.; Wraight, C. A., The electric field generated by photosynthetic reaction center induces rapid reversed electron transfer in the bc(1) complex. *Biochemistry* 2001, *40* (42), 12584-12590.
23. Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.; Nover, L.; von Koskull-Döring, P., *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. Wiley: 2005.
24. Koepke, J.; Krammer, E.-M.; Klingen, A. R.; Sebban, P.; Ullmann, G. M.; Fritzsche, G., pH Modulates the Quinone Position in the Photosynthetic Reaction Center from Rhodobacter sphaeroides in the Neutral and Charge Separated States. *Journal of Molecular Biology* 2007, *371* (2), 396-409.
25. Leonova, M. M.; Fufina, T. Y.; Vasilieva, L. G.; Shuvalov, V. A., Structure-function investigations of bacterial photosynthetic reaction centers. *Biochemistry Moscow* 2011, *76* (13), 1465-1483.
26. Mitchell, P., Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: Protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Letters* 1975, *56* (1), 1-6.

27. Banwell, E. M. M. C. N., *Fundamentals of Molecular Spectroscopy: 4e*. Tata McGraw-Hill Publishing Co: 1994.
28. Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B., *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Thieme Georg Verlag: 2005.
29. Otto, M., *Analytische Chemie*. Wiley VCH Verlag GmbH: 2011.
30. Griffiths, P. R., *Chemical infrared Fourier transform spectroscopy*. Wiley: 1975.
31. Harrick, N. J., SURFACE CHEMISTRY FROM SPECTRAL ANALYSIS OF TOTALLY INTERNALLY REFLECTED RADIATION*. *The Journal of Physical Chemistry* 1960, 64 (9), 1110-1114.
32. Fahrenfort, J., Attenuated total reflection: A new principle for the production of useful infra-red reflection spectra of organic compounds. *Spectrochimica Acta* 1961, 17 (7), 698-709.
33. Meschede, D.; Gerthsen, C., *Gerthsen Physik*. Springer: 2010.
34. Harrick, N. J., *Internal reflection spectroscopy*. Interscience Publishers: 1967.
35. Harrick, N. J., Electric Field Strengths at Totally Reflecting Interfaces. *J. Opt. Soc. Am.* 1965, 55 (7), 851-856.
36. Osawa, M., Surface-enhanced infrared absorption. *Near-Field Optics and Surface Plasmon Polaritons* 2001, 81, 163-187.
37. Hartstein, A.; Kirtley, J. R.; Tsang, J. C., Enhancement of the Infrared Absorption from Molecular Monolayers with Thin Metal Overlayers. *Physical Review Letters* 1980, 45 (3), 201-204.
38. Nowak, C.; Luening, C.; Knoll, W.; Naumann, R. L. C., A Two-Layer Gold Surface with Improved Surface Enhancement for Spectro-Electrochemistry Using Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 2009, 63 (9), 1068-1074.
39. Barsoukov, E.; Macdonald, J. R., *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*. John Wiley & Sons: 2005.
40. Demtröder, W., *Experimentalphysik 2: Elektrizität und Optik*. Springer: 2008.
41. Kittel, C., *Introduction to solid state physics*. Wiley: 1971.
42. (a) Friedrich, M. G.; Robertson, J. W. F.; Walz, D.; Knoll, W.; Naumann, R. L. C., Electronic Wiring of a Multi-Redox Site Membrane Protein in a Biomimetic Surface Architecture. *Biophysical journal* 2008, 94 (9), 3698-3705; (b) Nowak, C.; Schach, D.; Gebert, J.; Grosserueschkamp, M.; Gennis, R. B.; Ferguson-Miller, S.; Knoll, W.; Walz,

- D.; Naumann, R. L. C., Oriented immobilization and electron transfer to the cytochrome c oxidase. *Journal of Solid State Electrochemistry* 2011, 15 (1), 105-114; (c) Schach, D.; Nowak, C.; Gennis, R. B.; Ferguson-Miller, S.; Knoll, W.; Walz, D.; Naumann, R. L. C., Modeling direct electron transfer to a multi-redox center protein: Cytochrome c oxidase. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2010, 649 (1-2), 268-276.
43. Remy, A.; Gerwert, K., Coupling of light-induced electron transfer to proton uptake in photosynthesis. *Nature Structural Biology* 2003, 10 (8), 637-644.
44. (a) Breton, J.; Boullais, C.; Burie, J. R.; Navedryk, E.; Mioskowski, C., BINDING-SITES OF QUINONES IN PHOTOSYNTHETIC BACTERIAL REACTION CENTERS INVESTIGATED BY LIGHT-INDUCED FTIR DIFFERENCE SPECTROSCOPY - ASSIGNMENT OF THE INTERACTIONS OF EACH CARBONYL OF Q(A) IN RHODOBACTER-SPHAEROIDES USING SITE-SPECIFIC C-13-LABELED UBIQUINONE. *Biochemistry* 1994, 33 (48), 14378-14386; (b) Breton, J.; Boullais, C.; Berger, G.; Mioskowski, C.; Navedryk, E., BINDING-SITES OF QUINONES IN PHOTOSYNTHETIC BACTERIAL REACTION CENTERS INVESTIGATED BY LIGHT-INDUCED FTIR DIFFERENCE SPECTROSCOPY - SYMMETRY OF THE CARBONYL INTERACTIONS AND CLOSE EQUIVALENCE OF THE Q(B) VIBRATIONS IN RHODOBACTER-SPHAEROIDES AND RHODOPSEUDOMONAS-VIRIDIS PROBED BY ISOTOPE LABELING. *Biochemistry* 1995, 34 (36), 11606-11616; (c) Noguchi, T., Fourier transform infrared spectroscopy of special pair bacteriochlorophylls in homodimeric reaction centers of heliobacteria and green sulfur bacteria. *Photosynthesis Research* 2010, 104 (2-3), 321-331.
45. (a) Navedryk, E.; Breton, J., Coupling of electron transfer to proton uptake at the QB site of the bacterial reaction center: A perspective from FTIR difference spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2008, 1777 (10), 1229-1248; (b) Breton, J.; Navedryk, E., Protein-quinone interactions in the bacterial photosynthetic reaction center: Light-induced FTIR difference spectroscopy of the quinone vibrations. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1996, 1275 (1-2), 84-90.
46. Leonhard, M.; Mantele, W., FOURIER-TRANSFORM INFRARED-SPECTROSCOPY AND ELECTROCHEMISTRY OF THE PRIMARY ELECTRON-DONOR IN RHODOBACTER-SPHAEROIDES AND RHODOPSEUDOMONAS-VIRIDIS REACTION CENTERS - VIBRATIONAL-MODES OF THE PIGMENTS

INSITU AND EVIDENCE FOR PROTEIN AND WATER MODES AFFECTED BY P+ FORMATION. *Biochemistry* 1993, 32 (17), 4532-4538.

47. Noda, I., 2-DIMENSIONAL INFRARED (2D IR) SPECTROSCOPY - THEORY AND APPLICATIONS. *Applied Spectroscopy* 1990, 44 (4), 550-561.

48. Stuart, B., *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Ltd: 1997; p 191.

49. Lamichhane, H. P.; Hastings, G., Calculated vibrational properties of pigments in protein binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, 108 (26), 10526-10531.

50. Nowak, C.; Santonicola, M. G.; Schach, D.; Zhu, J.; Gennis, R. B.; Ferguson-Miller, S.; Baurecht, D.; Walz, D.; Knoll, W.; Naumann, R. L. C., Conformational transitions and molecular hysteresis of cytochrome c oxidase: Varying the redox state by electronic wiring. *Soft Matter* 2010, 6 (21), 5523-5532.

51. (a) Mantsch, H. H.; McElhaney, R. N., PHOSPHOLIPID PHASE-TRANSITIONS IN MODEL AND BIOLOGICAL-MEMBRANES AS STUDIED BY INFRARED-SPECTROSCOPY. *Chemistry and Physics of Lipids* 1991, 57 (2-3), 213-226; (b) Arrondo, J. L. R.; Castresana, J.; Valpuesta, J. M.; Goni, F. M., STRUCTURE AND THERMAL-DENATURATION OF CRYSTALLINE AND NONCRYSTALLINE CYTOCHROME-OXIDASE AS STUDIED BY INFRARED-SPECTROSCOPY. *Biochemistry* 1994, 33 (38), 11650-11655; (c) Casal, H. L.; Cameron, D. G.; Smith, I. C. P.; Mantsch, H. H., ACHOLEPLASMA-LAIDLAWII MEMBRANES A FOURIER TRANSFORM IR STUDY OF THE INFLUENCE OF PROTEIN ON LIPID ORGANIZATION AND DYNAMICS. *Biochemistry* 1980, 19 (3), 444-451.

52. Nabedryk, E.; Mantele, W.; Tavitian, B. A.; Breton, J., LIGHT-INDUCED FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPIC INVESTIGATIONS OF THE INTERMEDIARY ELECTRON ACCEPTOR REDUCTION IN BACTERIAL PHOTOSYNTHESIS. *Photochemistry and Photobiology* 1986, 43 (4), 461-465.

53. Nabedryk, E.; Bagley, K. A.; Thibodeau, D. L.; Bauscher, M.; Mantele, W.; Breton, J., A PROTEIN CONFORMATIONAL CHANGE ASSOCIATED WITH THE PHOTOREDUCTION OF THE PRIMARY AND SECONDARY QUINONES IN THE BACTERIAL REACTION CENTER. *FEBS Letters* 1990, 266 (1-2), 59-62.

54. (a) Ginnet, N.; Lavergne, J., Interactions between the donor and acceptor sides in bacterial reaction centers. *Biochemistry* 2000, 39 (51), 16252-16262; (b) Shinkarev, V.

P., Ubiquinone (coenzyme Q(10)) binding sites: Low dielectric constant of the gate prevents the escape of the semiquinone. *Febs Letters* 2006, 580 (11), 2534-2539.

55. Naumann, R.; Schiller, S. M.; Giess, F.; Grohe, B.; Hartman, K. B.; Karcher, I.; Koper, I.; Lubben, J.; Vasilev, K.; Knoll, W., Tethered lipid Bilayers on ultraflat gold surfaces. *Langmuir* 2003, 19 (13), 5435-5443.

56. Goldsmith, J. O.; Boxer, S. G., Rapid isolation of bacterial photosynthetic reaction centers with an engineered poly-histidine tag. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1996, 1276 (3), 171-175.

57. Kirmaier, C.; Laible, P. D.; Czarnecki, K.; Hata, A. N.; Hanson, D. K.; Bocian, D. F.; Holten, D., Comparison of M-Side Electron Transfer in Rb. sphaeroides and Rb. capsulatus Reaction Centers. *The Journal of Physical Chemistry B* 2002, 106 (7), 1799-1808.

58. Guergova-Kuras, M.; Salcedo-Hernandez, R.; Bechmann, G.; Kuras, R.; Gennis, R. B.; Crofts, A. R., Expression and One-Step Purification of a Fully Active Polyhistidine-Tagged Cytochromebc₁Complex from Rhodobacter sphaeroides. *Protein Expression and Purification* 1999, 15 (3), 370-380.