
**ELEKTROCHEMISCH GESTEUERTE
ZEITAUFGELÖSTE INFRAROTSPEKTROSKOPIE
AN REDOX-MEMBRANPROTEINEN IN EINER
BIOMIMETISCHEN
MEMBRAN-ARCHITEKTUR**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der

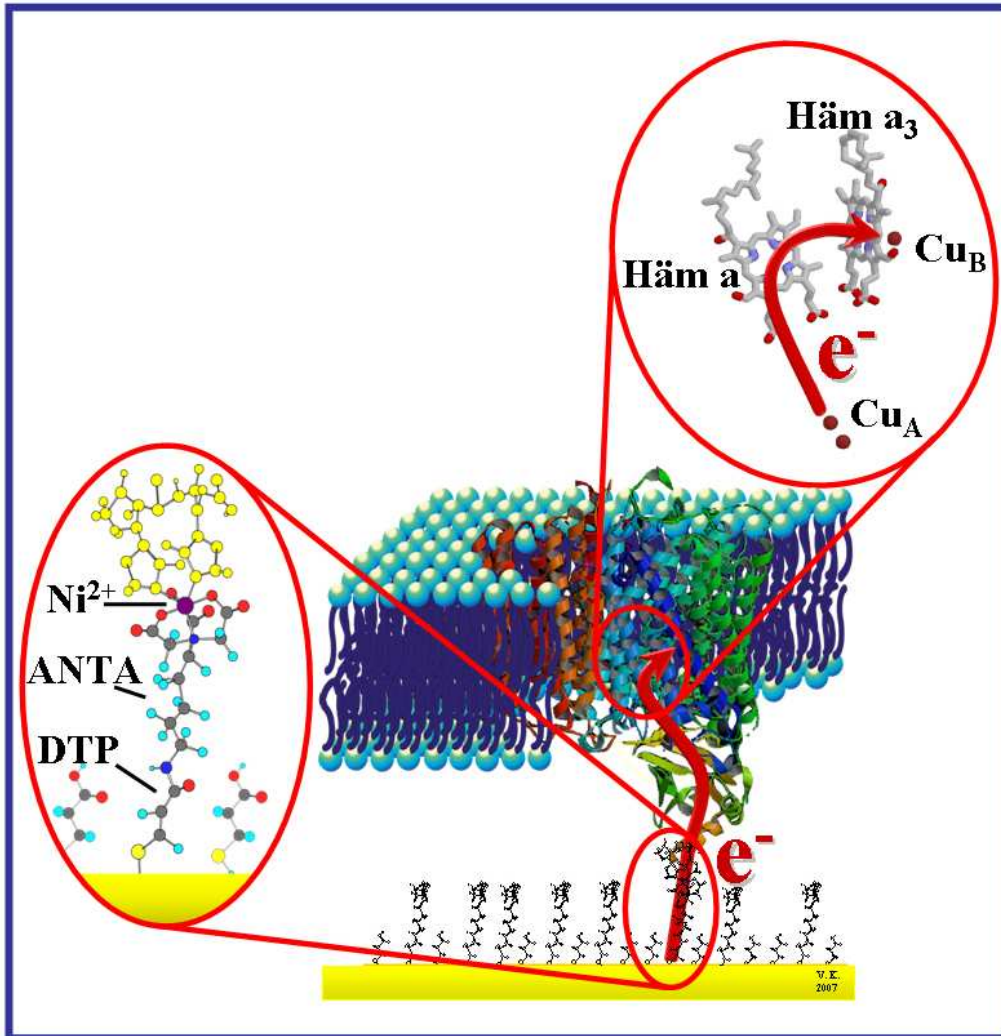
Johannes-Gutenberg-Universität
Mainz

Vinzenz Ulrich Kirste

geb. in Mainz

Mainz, November 2007

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2007



Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz in der Zeit von November 2004 bis November 2007 angefertigt.

Abstract - deutsch

Das Protein Cytochrom c Oxidase (CcO) ist ein Enzym der mitochondrialen Atmungskette. Als letzter Komplex (Komplex IV) einer Elektronentransportkette katalysiert sie die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser. Hierbei werden Elektronen von Cytochrom c (Cc) in das Enzym geleitet. Die durch den Redoxprozess freiwerdende freie Enthalpie wird dazu genutzt, einen Protonengradienten über die innere Mitochondrien-Membran aufzubauen. Die zurückwandernden Protonen treiben in der ATP-Synthase die Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) an, dem universellen Energieträger in lebenden Organismen.

Gegenstand dieser Dissertation sind zeitaufgelöste ATR-FTIR-Messungen des direkten Elektronentransfers in die CcO. Das Protein wird hierzu orientiert auf einer Goldelektrode immobilisiert und in eine künstliche Membran rekonstituiert (Protein-tethered Bilayer Lipid Membrane, ptBLM). Das ptBLM-System wird hinsichtlich einer möglichst hohen Protein-Aktivität optimiert. Elektronen werden durch elektrochemische Anregung von der Elektrode in die CcO injiziert. Die Goldoberfläche wird auf die reflektierende Oberfläche eines Silizium-ATR-Kristalls aufgebracht. Durch die Präparation einer rauen Oberfläche (RMS-Rauigkeit ≈ 5 nm) wird eine Verstärkung der IR-Absorption erreicht.

Die mit den Ladungstransferprozessen einhergehenden Konformationsänderungen der die Redoxzentren umgebenden Gruppen (CONH-Gerüst und Aminosäure-Seitenketten) können durch Infrarot-Spektroskopie nachgewiesen werden. Phasensensitive Detektion (PSD) wird zur Rauschminderung eingesetzt, um Geschwindigkeitskonstanten für die Redox-Übergänge zu bestimmen.

Im Bereich der Amid-I-Bande werden etliche Peaks identifiziert, die sich mit dem Redoxzustand des Proteins ändern. Für das Cu_A -Zentrum, welches als erstes der vier Redoxzentren der CcO reduziert wird, wird die schnellste Geschwindigkeitskonstante $k_s = 4870/\text{s}$ ermittelt. Für das Häm a_3 -Zentrum wird eine Geschwindigkeitskonstante von $k_s = 13,8/\text{s}$ ermittelt. Die Ergebnisse sind konsistent zu elektrochemischen und Raman-Spektroskopie-Experimenten, welche ebenfalls in unserer Gruppe durchgeführt wurden.

Weitere Themen dieser Dissertation sind der Nachweis der Anwendbarkeit des ptBLM-Systems für andere Membranproteine (Beispiel: bakterielles photosynthetisches Reaktionszentrum) und der Einsatz des ATR-FTIR-Setups für verschiedene künstliche Membransysteme (Aktivitätsnachweis des OR5-Geruchsrezeptors in einer peptidgestützten Membran, Eigenschaften eines Oligoethylenglycol-Spacers).

Abstract - english

The protein Cytochrome c Oxidase (CcO) is part of the mitochondrial respiratory chain. It is the last complex (complex IV) of this electron transport chain and catalyzes the reduction of molecular oxygen to water. Electrons are transferred from Cytochrom c (Cc) into the enzyme. The free enthalpy which is released during this redox reaction is used to build a proton gradient over the inner mitochondrial membrane. The protons are transferred back into the matrix by the ATP synthase and drive the synthesis of adenosine triphosphate (ATP), which is the universal energy source of living organisms.

This thesis deals with time-resolved ATR-FTIR-measurements of direct electron transfer into CcO. The protein is therefore immobilised on a gold electrode in a strictly oriented fashion and reconstituted in an artificial membrane (protein-tethered bilayer lipid membrane, ptBLM). The ptBLM-system is optimized in terms of a high protein activity. Electrons are injected by electrochemical excitation from the electrode into the CcO. The gold surface is deposited on top of the reflecting surface of a silicon ATR-crystal. Using a rough gold surface (RMS roughness ≈ 5 nm) leads to an enhancement of the infrared absorption.

Conformational changes of groups surrounding the redox centres (CONH backbone and amino-acid side chains) related to the charge transfer processes are detected by infrared spectroscopy. Phase sensitive detection is used to improve the signal-to-noise ratio (SNR) in order to calculate rate constants for the redox transitions. In the region of the amide-I-band several peaks can be identified, which change with the redox state of the protein. For the Cu_A center, which is reduced as the first of the four redox centres, the highest rate constant of $k_s=4870/\text{s}$ is calculated. For the heme a_3 center a rate constant of $k_s = 13,8/\text{s}$ is calculated. The results are consistent with electrochemical and Raman-spectroscopy experiments, which were also performed by our group. Further topics of this thesis are the proof of the ptBLM-system for other membrane proteins (e.g. the bacterial photosynthetic reaction center) and the applicability of the ATR-FTIR-setup for different artificial membrane systems (proof of the activity of an OR5 odorant receptor in a peptide supported membrane, characteristics of an oligoethylenglycol-spacer).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Motivation	5
3	Die Atmungskette und die Cytochrom c Oxidase	9
3.1	Die Zellmembran und Membranproteine	9
3.2	Die Atmungskette	10
3.3	Die Cytochrom c Oxidase	14
3.4	Katalytischer Zyklus der Cytochrom c Oxidase	20
3.4.1	Elektronentransferwege und Intermediate des katalytischen Zyklus	20
3.4.2	Protonentransferwege in der CcO	22
3.4.3	Modelle für den katalytischen Zyklus	24
3.5	Die Protein-verankerte Lipid-Membran	27
3.6	Das bakterielle Reaktionszentrum	31
I	Theoretische Grundlagen und Messmethoden	35
4	Infrarotspektroskopie	37
4.1	Absorption von Infrarotstrahlung	37
4.1.1	Freiheitsgrade eines Moleküls und Eigenmoden der Molekülschwingungen	38
4.1.2	Klassische Behandlung der Schwingung eines zweiatomigen Moleküls	39
4.1.3	Quantenmechanische Beschreibung der Molekülschwingung	41
4.1.4	Infrarotspektroskopie an Proteinen	43

4.1.4.1	Schwingungen der CONH-Gruppe des Polypeptid-Gerüsts	46
4.1.4.2	Einfluss der Sekundärstrukturtypen auf die Lage der Amid-Banden	48
4.2	FTIR-Spektroskopie	50
4.2.1	Grundlagen der FTIR-Absorptions-Spektroskopie	50
4.2.2	Methoden der zeitaufgelösten Infrarotspektroskopie	55
4.2.2.1	Rapid-Scan-Mode	55
4.2.2.2	Step-Scan-Mode	55
4.3	ATR-FTIR-Spektroskopie	56
4.3.1	Abgeschwächte Totalreflexion (ATR)	56
4.3.2	Absorption von IR-Strahlung in der ATR-Konfiguration	58
4.3.3	Oberflächenverstärkte ATR-FTIR-Spektroskopie	60
4.4	Phasensensitive Detektion (PSD) bei Modulations-angeregter FTIR-Spektroskopie	63
4.4.1	Grundlagen der phasensensitiven Detektion	63
4.4.2	Modulierte Anregung	66
4.4.3	Fourieranalyse	67
4.4.4	Phasensensitive Detektion	70
4.4.5	PSD zeitaufgelöster Spektren	72
5	Elektrochemie	79
5.1	Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS)	79
5.1.1	Die elektrische Doppelschicht	80
5.1.2	Messprinzip der elektrochemischen Impedanzspektroskopie	82
5.1.3	Die verschiedenen Darstellungsarten für Impedanzspektren	85
5.1.4	Schaltkreiselemente	85
5.1.5	Beispiele einfacher Ersatzschaltkreise	86
5.1.5.1	Reiner Ohmscher Widerstand	87
5.1.5.2	Reiner Kondensator	89
5.1.5.3	Reihenschaltung aus Widerstand und Kondensator	91
5.1.5.4	Parallelschaltung aus Widerstand und Kondensator	93
5.1.5.5	Ersatzschaltbild für ein RC-Glied mit vorgeschaltetem Ohmschen Widerstand	94

INHALTSVERZEICHNIS

5.1.5.6	Ersatzschaltbild für zwei in Reihe geschaltete RC-Glieder mit vorgeschaltetem Ohmschen Widerstand	96
5.2	Cyclovoltammetrie	100
5.2.1	Experimentelle Grundlagen	100
5.2.2	Cyclovoltammetrie gelöster Redox-Spezies	101
5.2.3	Cyclovoltammetrie an Schichten oberflächengebundener Redoxspezies	106
6	Weitere Messmethoden	109
6.1	Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR)	109
6.1.1	Elektromagnetische Beschreibung von Oberflächenplasmonen	110
6.1.2	Anregung von Oberflächenplasmonen	116
6.1.3	Schichtdickenbestimmung mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie	120
6.1.4	Rasterkraftmikroskopie (AFM)	122
II	Probenpräparationen und Messaufbauten	127
7	Probenpräparationen	129
7.1	Präparation ultraflacher Goldoberflächen	129
7.2	Präparation rauer Goldflächen	131
7.3	Präparation einer Protein-verankerten Lipid-Membran (ptBLM) mit der Cytochrom c Oxidase	133
7.3.1	Präparation der Spacer- bzw. Ankerregion	133
7.3.2	Anbindung der Cytochrom c Oxidase an die Ankergruppe und Rekonstitution der Proteinschicht in eine Lipid-Membran	135
7.3.3	Untersuchungen am ptBLM-System, Arbeiten ohne Sauerstoff	136
7.4	Herstellung eines DPTL-Monolayers für die Untersuchungen in Abschnitt 9.2.	138
7.5	Herstellung einer peptidfixierten Membran und In-vitro-Expressierung eines GPCRs für die Untersuchungen in Abschnitt 9.3.	138
8	Messaufbauten	141

8.1	Der Messaufbau für Experimente der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR) und der Elektrochemie	141
8.1.1	SPR-Messaufbau	141
8.1.2	SPR-Zelle mit elektrochemischer Kontaktierung	142
8.2	Der Messaufbau für Experimente der elektrochemisch gesteuerten ATR-FTIR-Spektroskopie	145
8.2.1	FTIR-Messaufbau	145
8.2.1.1	Der ATR-Kristall	145
8.2.2	Der Probenkammereinsatz und die spektroelektrochemische Messzelle	146
8.2.3	Zeitaufgelöste ATR-FTIR-Messungen	149
8.3	Rasterkraftmikroskopie (AFM)	152
8.3.1	Probenherstellung	152
8.3.2	Messaufbau	152

III Ergebnisse und Diskussionen155

9	ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung des Aufbaus von verankerten Lipid-Membranen (tBLMs und ptBLMs)	159
9.1	Der Oberflächenverstärkungseffekt	159
9.1.1	Oberflächencharakterisierung des Goldfilms mittels AFM .	160
9.1.2	Bestimmung des Oberflächenverstärkungseffekts	161
9.1.3	Diskussion von Abschnitt 9.1	161
9.2	Wechselwirkungen eines Thiolipid-Monolayers mit wässriger Elektrolyt-Lösung und Auswirkungen auf die elektrischen Eigenschaften des Monolayers	163
9.2.1	DPTL als Ankermolekül für Lipidmembranen	163
9.2.2	Auswirkungen der Wasserabsorption auf die elektrischen Eigenschaften des DPTL-Monolayers	165
9.2.3	ATR-FTIR-Spektroskopie der Wasserabsorption durch den DPTL-SAM	166
9.2.4	Diskussion von Abschnitt 9.2	170
9.3	Inkorporation von in-vitro synthetisierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in ein peptidfixiertes artifizielles Membransystem . . .	171

INHALTSVERZEICHNIS

9.3.1	Nachweis der Ligandenerkennung des OR5-Geruchsrezeptors mittels ATR-FTIR-Spektroskopie	173
9.4	Optimierung des Aufbaus der Protein-verankerten Lipidmembran mit der Cytochrom c Oxidase	175
9.4.1	Definierte Variation der Belegungsdichte des CcO-Monolayers	176
9.4.2	Analyse des TP/TP-NTA-Monolayers mittels XPS-Messungen	177
9.4.3	Modellrechnung zur Oberflächenbelegung in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis DTSP zu DTP in Lösung	180
9.4.4	Vergleich der Anbindungskinetiken von ANTA auf einer unverdünnten TSP-Schicht und einer 60Mol%-verdünnten Schicht mit ATR-FTIR-Spektroskopie	182
9.4.5	Ermittlung des Anteils aktiver oberflächengebundener CcO-Moleküle mittels Cyclovoltammetrie	183
9.4.6	Analyse der CcO-Anbindung und der Membran-Rekonstitution für verschiedene Verdünnungen mittels SPR und EIS	186
9.4.7	Charakterisierung der CcO-Monolayer mittels AFM	189
9.4.8	Diskussion des Abschnitts 9.4	190
9.5	Systematischer Aufbau der Protein-verankerten Lipidmembran und Charakterisierung mit verschiedenen Methoden	192
9.5.1	Verfolgung des Schichtaufbaus des optimierten ptBLM-Systems mit Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie	193
9.5.2	Verfolgung des Schichtaufbaus mit ATR-FTIR-Spektroskopie	196
9.5.2.1	ANTA-Kopplung und Ni-Komplexierung	196
9.5.2.2	Anbindung der Cytochrom c Oxidase	199
9.5.2.3	Rekonstitution der oberflächenverankerten CcO in eine Lipid-Membran	206
9.5.3	Verfolgung des Schichtaufbaus mit elektrischer Impedanzspektroskopie	208
9.6	Untersuchungen der Funktionalität der Cytochrom c Oxidase in der inversen Orientierung mit dem optimierten ptBLM-System	212
9.6.1	Zusammenfassung der Abschnitte 9.5 und 9.6	214
9.7	Übertragung des ptBLM-Systems auf andere Systeme	217

9.7.1	Orientierte Immobilisierung des bakteriellen photosynthetischen Reaktionszentrums in der ptBLM-Architektur . . .	217
9.7.2	Verfolgung des Schichtaufbaus mit SPR	217
9.7.3	Verfolgung der Anbindung mit ATR-FTIR-Spektroskopie .	218
9.7.4	Ladungstransferprozesse im Reaktionszentrum	221
10 Zeitaufgelöste ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung der Kinetik des direkten Elektronentransfers in der CcO		223
10.1	Potentiostatische Messungen	224
10.2	Kinetische Parameter der Oxidoreduktion des Häm a_3 -Zentrums .	227
10.2.1	Phasenlage der identifizierten Banden	228
10.3	Kinetische Parameter der Oxidoreduktion des Cu_A - und des Häm a_3 -Zentrums	233
10.3.1	Langsame Anregungsfrequenz- 0,13 Hz	233
10.3.2	Mittlerer Bereich- Anregungsfrequenz 100 Hz	236
10.3.3	Hohe Anregungsfrequenz- 1 kHz	239
10.4	Ausschluss unspezifischer Banden durch ein Vergleichsexperiment mit CcO in der Down-Konfiguration	242
10.5	Messung unter aeroben Bedingungen	244
10.6	Zusammenfassung von Abschnitt 10	247
11 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen		249
12 Ausblick		255
IV Anhang		257
A Datenaufnahme und Auswertung		259
A.1	SPR-Messungen	259
A.1.1	Datenaufnahme	259
A.1.2	Auswertung der SPR-Daten mit Winspace	259
A.2	Elektrochemische Experimente	263
A.2.1	Elektrochemische Impedanzmessungen und Auswertungen	263
A.2.2	Cyclovoltammetrie-Messungen und Auswertungen	265
A.2.3	Elektrochemische Steuerung von Redoxprozessen	265

INHALTSVERZEICHNIS

A.3	Infrarotspektroskopische Experimente	266
A.3.1	Datenaufnahme stationärer und zeitaufgelöster Spektren	266
A.3.2	Die OPUS-Fitroutine	266
A.3.3	Das PSD-Makro	268
B	Material	271
B.1	Geräte	271
B.2	Chemikalien	272
B.3	Weitere Materialien	274
C	Konstruktionszeichnungen	277
C.1	ATR-FTIR-Probenkammer und Messzelle	277
C.1.1	Probenkammereinsatz	277
C.1.2	Messzelle	280
D	Tabellen	285
D.1	Aminosäuren	286
D.2	Infrarotabsorption durch Methylgruppen	287
D.3	Zuordnung von IR-Banden zur Oxidoreduktion der einzelnen Redoxzentren der CcO	288
E	Glossar	293
	Abbildungsverzeichnis	297
	Tabellenverzeichnis	312
	Literaturverzeichnis	315

Kapitel 1

Einleitung

Die mitochondriale Atmungskette ist Gegenstand vielfältiger Forschungen. Obwohl die grundsätzlichen Abläufe zum großen Teil bekannt sind, sind doch einige Prozesse im Detail nicht aufgeklärt. In der Atmungskette fungieren vier Membranproteine gemeinsam als Elektronentransportkette, wobei durch Redoxprozesse freiwerdende freie Enthalpie genutzt wird, um einen Protonengradienten aufzubauen. Die Protonen wandern durch das letzte Protein der Atmungskette, die ATP-Synthase, zurück in die Mitochondrienmatrix und treiben dadurch die ATP-Synthese an. ATP (Adenosintriphosphat) dient Organismen als universeller Energieträger und tritt in den meisten energieaufwändigen Prozessen wie Bewegung, aktiver Transport oder Biosynthesen als Donor freier Enthalpie auf. Die im menschlichen Körper vorhandene Menge an ATP beträgt 50 mg, sie unterliegt aber einem gewaltigen Umsatz, welcher im Ruhezustand bei etwa 65 kg pro Tag liegt [1].

Die Möglichkeiten, Membranproteine zu erforschen, reichen von der reinen Strukturaufklärung bis hin zur Untersuchung dynamischer Prozesse. Dabei gilt es, besondere Anforderungen zu erfüllen. Im Gegensatz zu Proteinen, die nicht in Membranen integriert sind, ist die Handhabung von Membranproteinen aufgrund ihres amphiphilen Charakters diffizil. In Lösung müssen sie mit einem Detergens stabilisiert werden, da sie ansonsten denaturieren. Die erste röntgenstrukturanalytische Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eines Membranproteins gelang Deisenhofer, Huber, Michel et al. 1985 am photosynthetischen Reaktionszentrum von Purpurbakterien (*Rhodospseudomonas viridis*) [2]. Bis heute ist erst ein sehr

kleiner Anteil der Membranproteine kristallografisch aufgeklärt und macht nur etwa 0,2% der insgesamt aufgeklärten Protein-Strukturen aus.

Diese Strukturuntersuchungen ermöglichen jedoch keine Aufklärung der Funktionalität des Proteins in einer membranartigen Umgebung. Diese Umgebung ist notwendig, um die Funktionalität eines Membranproteins unter natürlichen, physiologischen Bedingungen untersuchen zu können. Die Entwicklung von Modellmembranen ist daher ein wichtiger Zweig biophysikalischer Forschungen. Gelöste Proteine werden dann in die künstliche Membran integriert.

Ein häufig verwendetes System stellen Proteoliposomen dar. Membranproteine werden in die sphärische Lipiddoppelschicht von Liposomen eingebaut. Die Lipiddoppelschicht umschließt einen Hohlraum, so dass die Transportaktivität durch Membranproteine untersucht werden kann. Mit dieser Methode wurden zahlreiche Untersuchungen angestellt (u.a. [3] [4] [5]). Schwierigkeiten treten z.B. auf, wenn die Konzentration einer Spezies im Innern der Liposomen oder das Transmembranpotenzial kontrolliert werden müssen.

Schwarze Filme (black Lipid Membranes, BLMs) sind freischwebende Membranen, die eine Pore zwischen zwei Kompartimenten einer Messzelle überspannen. Parameter wie die Konzentration bestimmter Spezies wie auch das Transmembranpotenzial können leicht kontrolliert werden, Membranproteine werden nicht in ihrer Funktionalität behindert [6]. Ein Problem dieser Technik stellt die geringe mechanische Stabilität dar.

Ein anderes Modellsystem sind festkörpergestützte Modellmembranen (solid supported Bilayer Lipid Membranes, sBLMs). Die Membranen sind auf einem -meist planaren- Substrat aufgebracht, wodurch oberflächenanalytische und elektrochemische Messmethoden zum Einsatz kommen können. Zudem bieten sBLMs gegenüber den bisher genannten Systemen ein hohes Maß an Stabilität [7]. Ein klarer Nachteil dieses Systems ist der begrenzte Submembranraum, wodurch nur ein kleines Ionenreservoir zur Verfügung steht. Membranproteine mit großen Einheiten außerhalb der Membran können nicht inkorporiert werden bzw. verlieren ihre Funktionalität.

Eine Weiterentwicklung der sBLMs stellen die verankerten Lipid-Membranen (tethered Bilayer Lipid Membranes, tBLMs) dar, die dieses Problem durch eine Spacergruppe unter der Membran zumindest teilweise beheben [8] [9] [10] [11]

[12]. tBLMs wurden dabei mit Oligoethylenglycol-Spacergruppen [10] oder mit Peptidgruppen [11] auf einer Oberfläche immobilisiert. TBLMs erfüllen die wichtige Voraussetzung eines hinreichend großen Submembranraums. Dieser dient zum einen als Ionenreservoir, zum anderen ermöglicht er vielen Membranproteinen eine Inkorporation in die Membran unter Erhaltung ihrer Funktionalität. Große und komplexe Membranproteine können dennoch in ihrer Funktionalität eingeschränkt werden, da die Membran unflexibel an die Oberfläche angebunden ist und die Ankergruppen die Proteine in ihrer Bewegungsfreiheit behindern können.

Protein-verankerte Lipid-Membranen (protein-tethered Bilayer Lipid Membranes, ptBLMs) sind eine spezielle Form der tBLMs. In diesem System, welches vor wenigen Jahren in unserer Gruppe entwickelt wurde [13], definiert das Protein selbst die Größe des Submembranraums, da der Anker am Protein gebunden ist. Es handelt sich um einen Histidin-Anker, der an rekombinante Proteine angefügt wird. Zwei Histidin-Reste des Ankers bilden mit einem Ni^{2+} -Ion einen Komplex, dessen andere Bindungsstellen durch die Endgruppe eines Nitrilotriessigsäure-(NTA-)Rests besetzt werden (Chelat-Komplex). Der NTA-Rest ist durch eine weitere Gruppe auf einer Goldoberfläche immobilisiert. Die Proteinschicht wird in eine Membran rekonstituiert. Das System wurde in verschiedenen Arbeiten für Untersuchungen an der Cytochrom c Oxidase benutzt [14] [15] [16] [17] [18] [19] und kommt in vorliegender Arbeit zum Einsatz. Gegenüber allen vorher beschriebenen künstlichen Membransystemen bietet das ptBLM-System den herausragenden Vorteil, dass Proteine in einer definierten Orientierung auf einer Oberfläche immobilisiert werden können. Die Orientierung wird durch die Lage des Histidin-Ankers definiert, welcher an unterschiedlichen Stellen des Proteins angebracht werden kann.

Wenn das Enzym so orientiert ist, dass der erste Elektronenakzeptor (Cu_A) zur Elektrode hin orientiert ist, kann es durch direkten Elektronentransfer angeregt werden. Da alle Proteine definiert in dieser Orientierung immobilisiert sind, kann in allen angebundenen Protein-Molekülen der direkte Elektronentransfer gleichzeitig initiiert werden. Dies eröffnet einmalige Möglichkeiten hinsichtlich der Untersuchung von Ladungstransferprozessen durch elektrochemische und spektroskopische Methoden. Durch die Immobilisierung auf einer Goldoberfläche bietet das System die Möglichkeit, elektrochemische und spektroskopische Methoden si-

multan einzusetzen. Zudem sind Prozesse in kurzer Zeit reversibel durchführbar (< Millisekunden [15]). Dies ist insbesondere für spektroskopische Anwendungen wichtig, da so hinreichend Signal aufakkumuliert werden kann.

Kapitel 2

Motivation

Die Cytochrom c Oxidase (CcO) als vierter Komplex der Atmungskette katalysiert die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser. Der katalytische Zyklus der CcO ist seit etlichen Jahren Forschungs- und Diskussionsobjekt. Die CcO hat vier Redoxzentren: ein Cu_A -Zentrum, welches während eines Zyklus als erstes reduziert wird. Es folgt ein Häm-Zentrum, das Häm a. Schließlich gelangen die Elektronen zum aktiven Zentrum des Proteins, welches aus einem weiteren Häm, dem Häm a_3 , und einem weiteren Kupfer-Ion, dem Cu_B besteht. Insgesamt werden vier Elektronen zum aktiven Zentrum geleitet, um die Reduktion eines Sauerstoff-Moleküls O_2 zu Wasser zu vollziehen. Hierfür werden vier Protonen benötigt, die ebenfalls zum aktiven Zentrum transportiert werden. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, besteht die Aufgabe der Atmungskette darin, einen Protonengradienten aufzubauen. So wird die bei der Reduktion des Sauerstoffs frei werdende freie Enthalpie benutzt, um während eines Zyklus vier zusätzliche Protonen aus der Matrix in das Cytoplasma des Mitochondriums zu pumpen.

Wie erläutert, bietet das ptBLM-System neue Möglichkeiten zur systematischen Untersuchung von Membranproteinen, da diese in einer definierten Orientierung immobilisiert werden. Die Cytochrom c Oxidase wurde mit dem ptBLM-System mittels Elektrochemie und Raman-Spektroskopie untersucht [15] (Friedrich et al.). Mit elektrochemischen Messungen konnte gezeigt werden, dass vier Elektronen durch direkten Elektronentransfer an der kompletten Reduktion des in der ptBLM-Konfiguration immobilisierten Enzyms beteiligt sind. Darüber hinaus konnten kinetische Konstanten für die Redoxprozesse in der CcO unter anaeroben Bedingungen bestimmt werden. In Raman-Spektroskopie-Experimenten konnten

Redoxprozesse der Häm-Zentren nachgewiesen werden. Die Raman-Spektroskopie spricht empfindlich auf die Redoxzustände der Metalloporphyrine in den Hämen (low-spin/high-spin) an, nicht aber auf die der Redoxzustände der Kupfer-Zentren.

Die Infrarotspektroskopie ist eine vielversprechende Technik, um an dieser Stelle anzusetzen. Änderungen im Redoxzustand der Redoxzentren stehen in Verbindung mit einer Konformationsänderung der umgebenden Polypeptidgruppen. Die CONH-Gruppe des Polypeptidgerüsts von Proteinen besitzt charakteristische Schwingungen, die sich mit Infrarotstrahlung anregen lassen, dies sind die Amid-Banden (s. Abschnitt 4.1.4 [20] [21]). In Kombination mit der Kenntnis der Schwingungsfrequenzen bestimmter Aminosäure-Seitenketten [22] sind mehrere Arbeiten publiziert worden, die über charakteristische Infrarot-Banden für den Redoxzustand der Redoxzentren der CcO berichten [23] [22] [24] [25] [26] [27] [28] [29]. Es gibt etliche Arbeiten zu Redox-Untersuchungen an der CcO [23] [4] [26] [30] [31]. Diese Messungen wurden jedoch stets an Protein in Lösung oder in unspezifischer Orientierung [23] [4] durchgeführt, da es bisher kein System gab, um das Protein orientiert zu immobilisieren. Hochzeitaufgelöste Messungen an der CcO lieferten Geschwindigkeitskonstanten von $k_0 \approx 4000/s$ [30]. Dazu wurde mit photoinduziertem Ladungstransfer gearbeitet, wodurch immer nur eine einzige Anregung möglich war. In der ptBLM-Konfiguration hingegen kann das Enzym viele Male hintereinander wiederholt elektrochemisch angeregt werden. Durch die definierte Orientierung lassen sich Ladungstransferprozesse in allen Protein-Molekülen auf der Oberfläche simultan anregen. Die damit verbundene Akkumulation von Absorptionssignal ermöglicht zeitaufgelöste FTIR-Messungen, ein einzelner Prozess hingegen liefert bei weitem nicht genug Signal zur Detektion. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Belegungsdichte.

Auf dieser Grundlage soll in vorliegender Arbeit zunächst nachgewiesen werden, dass auch die Cu-Zentren Redoxprozesse durchlaufen und dass das Cu_A-Zentrum erster Elektronenakzeptor ist. Wie bereits erläutert, konnten durch Raman-spektroskopische Experimente nur Redoxänderungen der Häm gemessen werden. Dies soll zunächst in Form einer potentiostatischen Titration geschehen. Durch die graduelle Veränderung des angelegten Potentials vom vollständig reduzierten zum vollständig oxidierten Zustand erhöht sich sukzessive die Wahr-

scheinlichkeit dafür, dass ein bestimmtes Redoxzentrum oxidiert ist. Ein kontinuierliches Anwachsen entsprechender charakteristischer Banden weist auf die gute Kontrollierbarkeit dieser Prozesse hin. Dieser Nachweis ist umso wichtiger, als das Redoxpotenzial der CcO im ptBLM-System eine Verschiebung zu negativen Potenzialen hin aufweist, deren Ursprung bis heute nicht mit Sicherheit aufgeklärt werden konnte. In [15] wurden durch eine solche potentiostatische Titration mittels Raman-Spektroskopie bereits die Redoxzustände der Häm nachgewiesen. Infrarotspektroskopische Messungen können diese Ergebnisse bestätigen und untermauern, wenn auch die Kupferzentren nachgewiesen werden können.

Das große Ziel, welches mit dieser Arbeit verfolgt wird, ist die zeitaufgelöste Messung der Redoxprozesse. Dabei soll zunächst unter anaeroben Bedingungen gearbeitet werden, um den direkten Elektronentransfer von der Cytochrom-c-Bindungsstelle zu den Redoxzentren isoliert betrachten zu können. Spektroskopische, hochzeitaufgelöste Messungen an der CcO sind mit elektrochemischer Anregung bisher noch nicht gelungen. Elektrochemische Messungen erlauben zwar, kinetische Konstanten zu berechnen, die Ladungstransferwege im Protein lassen sich jedoch nicht verfolgen. Es ist daher von großem Interesse, die Infrarotspektroskopie zu diesem Zweck zu nutzen.

Das ptBLM-System hat sich bereits als unverzichtbar für die genannten Untersuchungen erwiesen. Im Zuge der systematischen Vorbereitungen der spektroelektrochemischen Experimente soll an einer weiteren Optimierung des Systems gearbeitet werden. Eine weitere Zielsetzung für die vorliegende Arbeit ist es, zu zeigen, dass das System auch für andere Membranproteine als die CcO einsetzbar ist.

Kapitel 3

Die Atmungskette und die Cytochrom c Oxidase

3.1 Die Zellmembran und Membranproteine

Die Zellmembran, auch Plasmamembran genannt, besteht im Wesentlichen aus einer semipermeablen Lipid-Doppelschicht, die alle lebenden Zellen umhüllt. Sie enthält eine Vielzahl an biologischen Molekülen, hauptsächlich Proteine und Lipide, welche an sehr vielen zellulären Prozessen beteiligt sind.

Die Zellmembran umschließt das Innere der Zelle, das Zytoplasma, und umhüllt die Zelle, schützt diese vor Außeneinflüssen und erfüllt damit eine ähnliche Funktion wie die Haut, die den gesamten Organismus umhüllt. Bei einigen Organismen (Bakterien, Archaea, Pflanzen und Pilze) übernimmt diese Funktion die Zellwand als zweite Barriere. Die Zellwand jedoch dient der mechanischen Stabilität, sie ist keine selektive Grenzschicht, wie dies die Zellmembran ist. Die Zellmembran reguliert den Stoffwechsel der Zelle. Darüber hinaus dient die Zellmembran der Anheftung der Zelle an das intrazelluläre Zytoskelett bzw. an die Zellwand.

Phospholipide stellen den größten Anteil der Zellmembran-Komponenten. Sie lagern sich zu einer Lipid-Doppelschicht mit einer hydrophilen Außenseite und einem hydrophoben Inneren an (s. Abbildung 3.1.1 (b)). Ein Phospholipid besteht aus zwei hydrophoben Fettsäureketten, einer Glycerol-Gruppe, einem Phosphat und einem Alkohol (s. Abbildung 3.1.1 (a)). Die hydrophile Eigenschaft ist wichtig für die Wechselwirkung der Zellmembran mit der meist hydrophilen Umgebung der Zellen.

Membranproteine sind in die Zellmembran eingebettet, Cholesterol-Moleküle stabilisieren die Membran (s. Abbildung 3.1.1 (c)). Diese Darstellung einer Zellmembran mit Membranproteinen zeigt, dass es verschiedenen Typen von Membranproteinen gibt. Integrale Membranproteine sind solche, die in die Membran integriert sind. Überspannen sie dabei die gesamte Membran, werden sie als Transmembranproteine bezeichnet. Integrale Membranproteine stehen in intensiver Wechselwirkung mit den Kohlenwasserstoffketten der Membranlipide und können deshalb nur mit Reagenzien solubilisiert werden, die ebenfalls unpolare Wechselwirkungen eingehen können. Oberflächenproteine oder auch periphere Membranproteine sind durch hydrophile, elektrostatische oder eine andere nicht-kovalente Wechselwirkung an die Lipidmembran oder ein integrales Membranprotein angebunden.

3.2 Die Atmungskette

Die Hauptaufgabe der Atmungskette in allen lebenden Organismen ist die Umwandlung der Energie, die bei der Reduktion von Sauerstoff durch NADH und FADH₂ frei wird, in die chemische Energie, die im Molekül Adenosintriphosphat (ATP) gespeichert wird. Dieser Prozess wird oxidative Phosphorylierung genannt, da die bei der Reduktion von Sauerstoff frei werdende Energie die Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP antreibt. ATP ist die „universelle Energieeinheit“ in lebenden Organismen, die die meisten Prozesse antreibt, bei denen Energie benötigt wird, wie Muskelkontraktion, Nervenregulation u.a. NADH wird in einer Abfolge von metabolischen Reaktionen aus Glukose und anderen Nährstoffen im Citratzyklus gebildet [33].

Der Gesamtprozess des aeroben Abbaus der Nährstoffe liefert mehr Energie, als der Abbau mit irgendeinem anderen Oxidationsmittel. Sauerstoff als Oxidationsmittel bildet jedoch während seiner Reduktion Radikale, welche giftig und gefährlich für den Organismus sind. Aus diesem Grund haben sich während der Evolution spezielle Enzyme herausgebildet, die die Sauerstoff-Reduktion kontrolliert katalysieren. Auf diese Weise werden keine gefährlichen Zwischenprodukte des Sauerstoffs freigesetzt.

3.2 Die Atmungskette

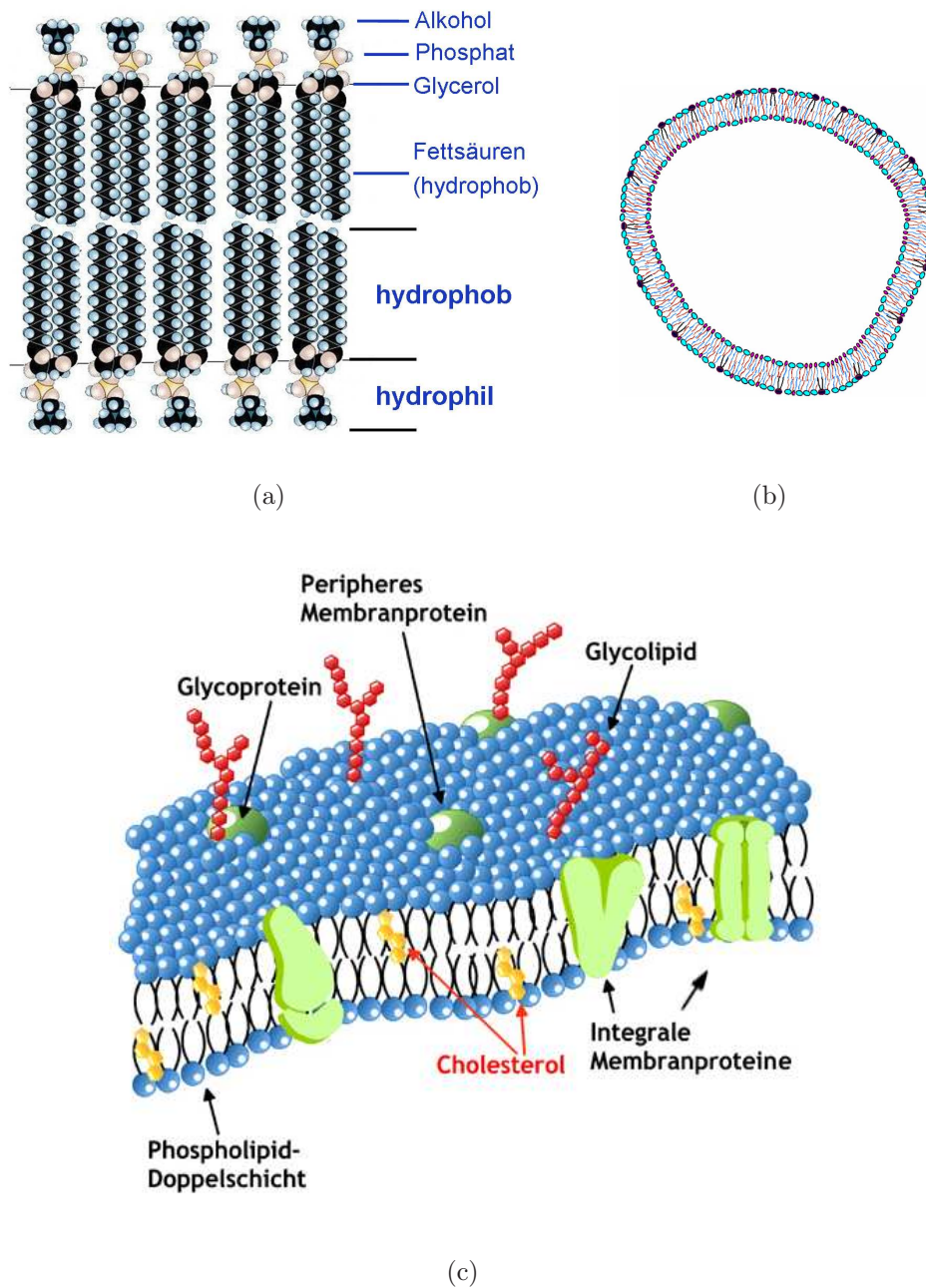


Abbildung 3.1.1: (a) Die Phospholipidmembran. Phospholipide lagern sich durch hydrophobe Wechselwirkungen der Fettsäureketten zu einer Doppelschicht mit hydrophiler Außenseite an; (b) schematische Darstellung einer Zelle mit Zellmembran; (c) detaillierte Darstellung einer Zellmembran mit Membranproteinen und weiteren Bestandteilen [32].

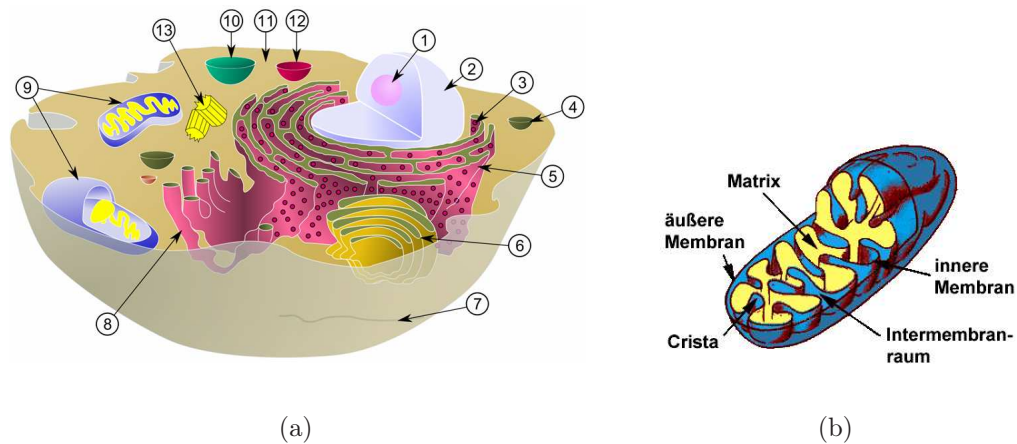
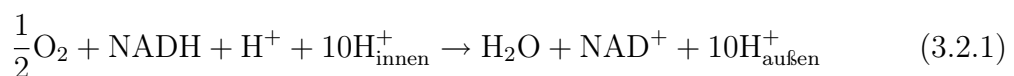


Abbildung 3.1.2: (a) Eukaryotische Zelle mit ihren Bestandteilen: 1 Nukleolus, 2 Zellkern, 3 Ribosomen, 4 Vesikel, 5 Raues endoplasmatisches Reticulum (ER), 6 Golgi-Apparat, 7 Mikrotubuli, 8 Glattes ER, 9 Mitochondrien, 10 Lysosom, 11 Zytoplasma, 12 Mikrobodies, 13 Zentriolen. (b) Vergrößerung eines Mitochondriums.

Die stark exergonische Reduktion von molekularem Sauerstoffs zu Wasser durch NADH und FADH₂ verläuft in einer Reihe von Elektronentransferreaktionen in einer Anordnung von Membranproteinen, die als Elektronentransport- oder Atmungskette bezeichnet wird. In eukaryotischen Organismen befindet sich die Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran (s. Abbildung 3.1.2 (b)) und wird als mitochondriale Atmungskette bezeichnet. In prokaryotischen Organismen ist sie in der Zytoplasmamembran lokalisiert.

Die mitochondriale Atmungskette besteht aus einer Elektronentransportkette, welche mit H⁺-Transport gekoppelt ist (Komplexe I-IV) und einer ATP-Synthase (Komplex V). Die Komplexe sind integrale Membranproteine (s. Abbildung 3.2.1). Bei der oxidativen Phosphorylierung wird das hohe Elektronenübertragungspotenzial des NADH oder des FADH₂ in das Phosphorylgruppenübertragungspotenzial des ATP umgewandelt. Die treibende Kraft der oxidativen Phosphorylierung ist das Elektronenübertragungspotenzial des NADH oder des FADH₂ gegenüber dem des O₂. Sie treibt den aktiven Transport von Protonen aus der Matrix des Mitochondriums in den Intermembranraum an:



3.2 Die Atmungskette

Gleichung 3.2.1 beschreibt die Reaktion, welche in mehreren aufeinander folgenden Schritten in den Komplexen der Atmungskette abläuft. Die freie Enthalpie, die bei dieser Reaktion frei wird, ist gegeben durch [34]:

$$\Delta\tilde{G}' = \Delta G^{o'} + RT \ln \frac{[\text{NAD}^+][\text{H}_2\text{O}][\text{H}_{\text{au\ss en}}^+]}{[\text{NADH}][\text{H}^+][\frac{1}{2}\text{O}_2][\text{H}_{\text{innen}}^+]} + nF\Delta\Phi_m \quad (3.2.2)$$

$$= \Delta G^{o'} + RT \ln \frac{[\text{NAD}^+][\text{H}_2\text{O}]}{[\text{NADH}][\text{H}^+][\frac{1}{2}\text{O}_2]} + RT \ln \frac{[\text{H}_{\text{au\ss en}}^+]}{[\text{H}_{\text{innen}}^+]} + nF\Delta\Phi_m \quad (3.2.3)$$

$$= \underbrace{\Delta G^{o'} + RT \ln \frac{[\text{NAD}^+][\text{H}_2\text{O}]}{[\text{NADH}][\text{H}^+][\frac{1}{2}\text{O}_2]}}_{\text{Chem. Umsetzung}} + \underbrace{RT \ln 10(\text{pH}_{\text{au\ss en}} - \text{pH}_{\text{innen}}) + nF\Delta\Phi_m}_{\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}} \quad (3.2.4)$$

Die ersten beiden Terme beschreiben die Enthalpie, die durch die chemische Umsetzung frei wird, die beiden letzten Terme beschreiben die Differenz des elektrochemischen Potentials des Protons zwischen Cytosol und Matrix. Die elektrochemische Potentialdifferenz setzt sich zusammen aus der Differenz des chemischen Potentials durch die unterschiedlichen H^+ -Ionen-Konzentrationen und der Potentialdifferenz über die Membran. Die freie Enthalpie, die bei der chemischen Umsetzung von NADH und O_2 zu NAD^+ und H_2O frei wird, beträgt $-220 \frac{\text{kJ}}{\text{Mol}}$ [33]. Unter typischen Bedingungen liegt der pH-Wert der inneren Mitochondrienmembran auf der Außenseite um 1,4 Einheiten niedriger als auf der Innenseite. Das Membranpotential beträgt 0,14 V, wobei die Außenseite positiv ist. Damit beträgt die Änderung der freien Enthalpie für ein Proton (n ist gleich Eins), das von der Matrix heraus auf die cytosolische Seite der Membran transportiert wird:

$$\begin{aligned} \Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+} &= RT \ln 10(\text{pH}_{\text{au\ss en}} - \text{pH}_{\text{innen}}) + nF\Delta\Phi_m \\ &= 8,315 \cdot 10^{-3} \frac{\text{kJ}}{\text{mol} \cdot \text{K}} \cdot 310\text{K} \cdot 2,303 \cdot 1,4 + (+1 \cdot 96,49 \frac{\text{kJ}}{\text{mol} \cdot \text{V}} \cdot 0,14\text{V}) \\ &= 21,82 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \end{aligned}$$

Bei zehn gepumpten Protonen pro Zyklus ändert sich die freie Enthalpie damit um $10 \cdot 21,82 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} = 218,2 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$. Dies ist nur geringfügig weniger als die $220 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$, die bei der Umsetzung von NADH und O_2 zu NAD^+ und H_2O frei werden.

Von NADH werden die Elektronen auf O_2 durch eine Kette aus drei großen Proteinkomplexen übertragen, die NADH-Q-Oxidoreduktase (Komplex I), die Q-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III) und die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV). Der Elektronenfluss innerhalb dieser Transmembrankomplexe bewirkt einen Protonentransport durch die innere Mitochondrienmembran. Die Elektronen werden vom Komplex I auf den nächsten Komplex der Kette (Komplex III) durch die reduzierte Form des Coenzym Q (Q) übertragen. Q wird auch als Ubichinon bezeichnet, da es in biologischen Systemen ein *ubiquitäres Chinon* ist. Dieses hydrophobe Chinon diffundiert schnell innerhalb der inneren Mitochondrienmembran. Ubichinon überträgt auch die von der Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus erzeugten Elektronen des FADH_2 auf die Q-Cytochrom-c-Oxidoreduktase, und zwar durch die Succinat-Q-Reduktase (Komplex II). Das Cytochrom c, ein kleines lösliches Protein, überträgt dann die Elektronen vom Komplex III zur Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV), der letzten Komponente der Kette, die auch die Reduktion des O_2 katalysiert. Der Elektronentransport über die Komplexe I, III und IV ist an eine Translokation von Protonen durch die Membran gekoppelt und hat somit einen Protonengradienten und ein Membranpotenzial zur Folge. Diese beiden Faktoren bilden gemeinsam den elektrochemischen Potenzialgradienten, welcher gemäß der chemiosmotischen Theorie zur ATP-Synthese aus ADP und P_i (anorganisches Phosphat) genutzt wird [33].

3.3 Die Cytochrom c Oxidase

Der letzte Schritt in der Elektronentransportkette ist die Oxidation des reduzierten Cytochrom c, das vom Komplex III erzeugt wurde. Er ist mit der Reduktion von O_2 zu zwei Molekülen H_2O gekoppelt. Diese Reaktion katalysiert die Cytochrom c Oxidase (Komplex IV). Die Struktur der in dieser Arbeit untersuchten bakteriellen Cytochrom c Oxidase ist in den Abbildungen 3.3.1 und 3.3.2 dargestellt.

Die in dieser Arbeit untersuchte Cytochrom c Oxidase stammt aus prokaryotischen Organismen. Die Untereinheitenstruktur bakterieller Atmungskettenenzy-

3.3 Die Cytochrom c Oxidase

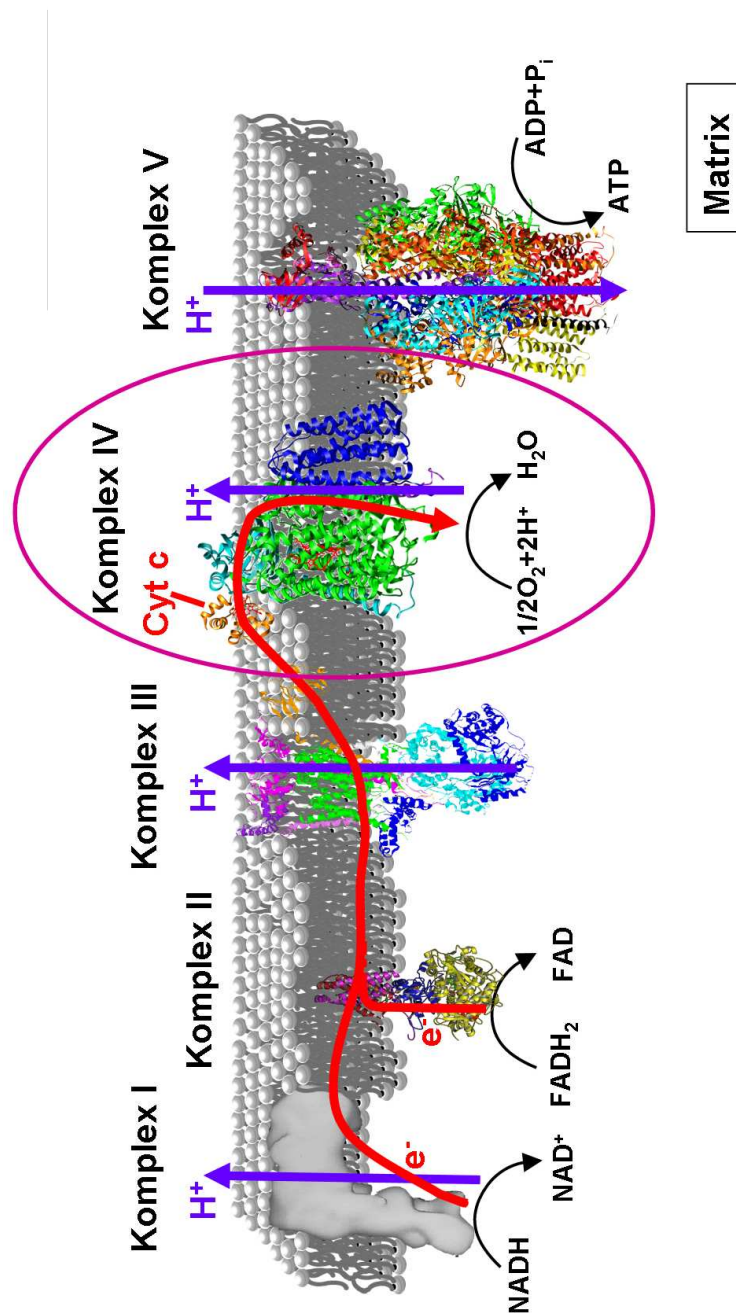


Abbildung 3.2.1: Die mitochondriale Atmungskette in der inneren Mitochondrien-Membran. Sie besteht aus einer Elektronentransportkette (Komplexe I-IV) und der ATP-Synthase (Komplex V). Elektronen werden von NADH oder von FADH_2 auf Sauerstoff übertragen, um Energie für die Bildung von ATP zu gewinnen.

me ist weitaus einfacher als die mitochondrialer Proteine. Hinzu kommt, dass prokaryotische Systeme einfacher auf genetischer Ebene verändert werden können. Da die bakteriellen Proteinkomplexe starke Homologien zu denen der mitochondrialen Atmungskette aufweisen und die Funktionsweise der prokaryotischen Atmungskette die gleiche ist wie die der eukaryotischen mitochondrialen Atmungskette, können die Ergebnisse der Untersuchungen an der aus prokaryotischen Organismen gewonnenen Cytochrom c Oxidase auf eukaryotische Organismen übertragen werden. Die in dieser Arbeit untersuchte bakterielle Cytochrom c Oxidase mit einem Histidin-Anker an der Cytochrom-c-Bindungseinheit wurde uns von Prof. B. Gennis, University of Illinois, zur Verfügung gestellt. Sie wurde aus *Rhodobacter Sphaeroides* gewonnen. Cytochrom c Oxidase, an die ein Histidin-Anker an die gegenüberliegende Seite des Proteins angefügt wurde, wurde aus *Paracoccus Denitrificans* gewonnen und wurde uns von Prof. B. Ludwig, Frankfurt, zur Verfügung gestellt. Die ortsspezifische Mutagenese der Cytochrom c Oxidase mit Anfügen eines Histidin-Ankers ist in [35] beschrieben.

In [36] ist die Bestimmung der Strukturauflösung der Cytochrom c Oxidase in der Auflösung von 2,3 Å beschrieben. Die entsprechenden Daten sind in der Protein-datenbank PDB unter dem Code 1m56 zugänglich und wurden für die Graphiken des Proteins in dieser Arbeit verwendet [37]. So können auch die genauen Abmessungen des Proteins bestimmt werden: Sie sind in Abbildung 3.3.1 eingezeichnet. Der Histidin-Anker, mit dem das Enzym immobilisiert wird, wird mittels Genmanipulation entweder an das C-terminale Ende von Untereinheit II (Abbildung 3.3.1 (a), spätere Immobilisierung in der sog. Down-Konfiguration) oder an das C-terminale Ende von Untereinheit I (Abbildung 3.3.2, spätere Immobilisierung in der sog. Up-Konfiguration) angefügt.

Die Cytochrom c Oxidase enthält zwei Häm-Gruppen und drei Kupferionen in zwei Kupferzentren, die als A und B bezeichnet werden. Das eine Zentrum, das aus zwei Cu_A -Ionen besteht, ist an zwei brückenbildende Cysteinreste gebunden. Dieses Zentrum nimmt als erstes Elektronen vom reduzierten Cytochrom c auf. Die beiden Hämoleküle, das Häm a und das Häm a_3 , sind zwar chemisch identisch, besitzen aber unterschiedliche Eigenschaften, da sie an verschiedenen Stellen in der Cytochrom-c-Oxidase angeordnet sind. Das Häm a übernimmt Elektronen vom Cu_A -Zentrum, dagegen transportiert das Häm a_3 Elektronen zum Cu_B , dem es direkt benachbart ist. Zusammen bilden Häm a_3 und Cu_B das aktive Zentrum,

3.3 Die Cytochrom c Oxidase

in dem O_2 zu H_2O reduziert wird.

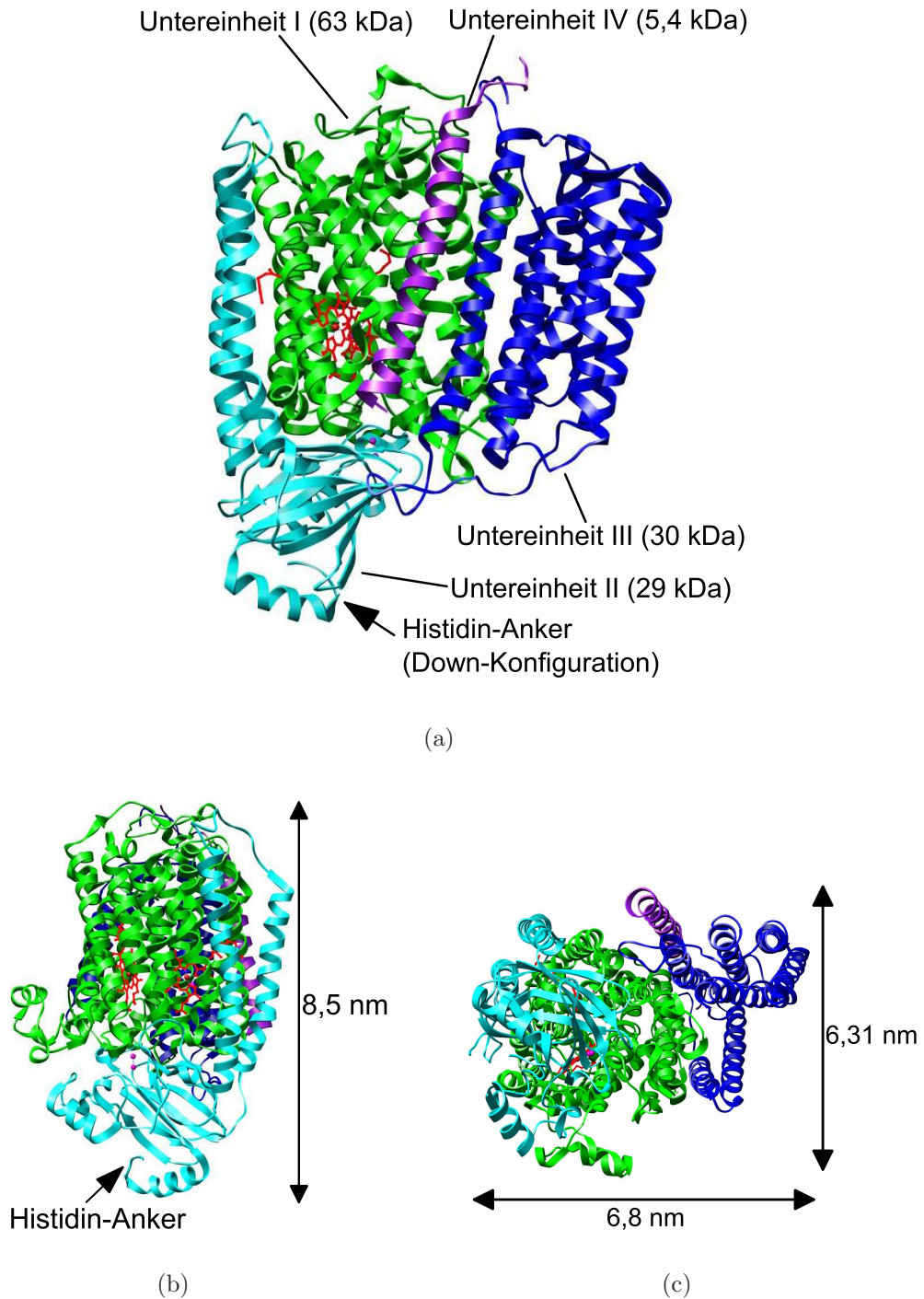


Abbildung 3.3.1: Die bakterielle Cytochrom c Oxidase; (a) und (b) sind Seitenansichten in der Membranebene, (c) ist die Ansicht aus dem Cytoplasma auf das Enzym. In (a) ist das C-terminale Ende von Untereinheit II markiert, an welches der Histidin-Anker für eine Immobilisierung in der Down-Konfiguration angefügt wird.

3.3 Die Cytochrom c Oxidase

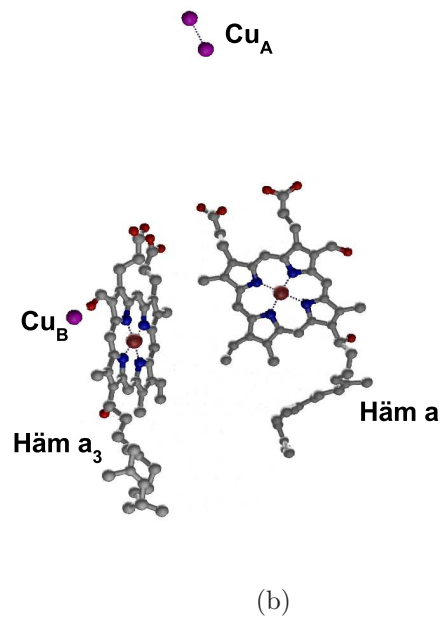
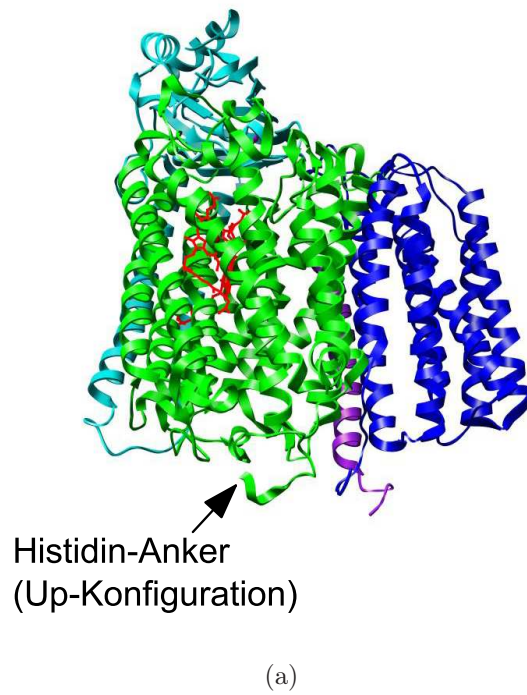


Abbildung 3.3.2: (a) CcO mit markiertem C-terminalen Ende von Untereinheit I, an welches der Histidin-Anker für eine Immobilisierung in der Up-Konfiguration angefügt wird; (b) Vergrößerung der vier Redoxzentren. Die CcO beinhaltet zwei Häm- und zwei Cu-Zentren.

3.4 Katalytischer Zyklus der Cytochrom c Oxidase

Der katalytische Zyklus der Cytochrom c Oxidase wird hier anhand der eukaryotischen Atmungskette mit der entsprechenden Lage der Atmungskette in der inneren Mitochondrien-Membran mit den entsprechenden Bezeichnungen (Matrix, Cytosol,...) beschrieben.

3.4.1 Elektronentransferwege und Intermediate des katalytischen Zyklus

Der katalytische Zyklus der Cytochrom c Oxidase ist seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Dabei wurde eine Fülle von Daten über die Struktur der in diesem Zyklus vorkommenden Intermediate gewonnen (s. Übersichtsartikel [38] [39] [40]).

Der katalytische Zyklus der Cytochrom c Oxidase beginnt mit der vollständig oxidierten Form des Enzyms (O-Zustand) (s. Abbildung 3.4.1). Nach Aufnahme des ersten Elektrons, welches von einem reduzierten Cytochrom-c-Molekül übertragen wird, bildet sich das erste Intermediat, der E-Zustand (electronated). Dabei equilibriert das aufgenommene Elektron zwischen Cu_A , Häm a und dem aktiven Zentrum [41]. Nach Aufnahme eines weiteren Elektrons von einem Cytochrom c entsteht das zweielektronen-reduzierte Intermediat (R-Zustand). Dieses ist in der Lage, molekularen Sauerstoff zu binden. Auch im Hämoglobin liegt das an Sauerstoff gebundene Eisen als Fe^{2+} vor, so dass die Cytochrom c Oxidase in diesem Zustand Sauerstoff aufnehmen kann. Es wird vermutet, dass das Sauerstoffmolekül zunächst an Cu_B [42] und schließlich an das reduzierte Häm a_3 bindet [43]. Es entsteht das Intermediat A. Dieses wird durch spontane elektronische Umorganisation in das Intermediat P_M (peroxy) überführt.

Man geht heute davon aus, dass das P_M -Intermediat eine Oxoferrylstruktur ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) beim Häm a_3 mit einem am Cu_B gebundenen Hydroxidion ($\text{Cu}_B^{2+}-\text{OH}$) aufweist. Diese Annahme wirft allerdings die Frage auf, woher die vier Elektronen stammen, die für die Spaltung der Sauerstoffbindung benötigt werden. Drei dieser Elektronen können normalerweise durch die Metallzentren zur Verfügung gestellt

3.4 Katalytischer Zyklus der Cytochrom c Oxidase

werden (zwei Elektronen durch die Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{4+} und ein Elektron durch die Oxidation von Cu^+ zu Cu^{2+}). Für die Herkunft des vierten Elektrons werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert, die als alternative Strukturen in Abbildung 3.4.1 dargestellt sind.

Nach Aufnahme des dritten Elektrons entsteht das Intermediat P_R . Seine Struktur unterscheidet sich nicht von der des Intermediates P_M , außer dass bei P_R kein Aminosäureradikal mehr vorliegt. [44].

Im weiteren Verlauf des katalytischen Zyklus kommt es zur Bildung des F-Intermediates (Ferryl). Durch die Einspeisung des vierten Elektrons ins binukleare Zentrum wird das F-Intermediat reduziert. Es entsteht das H-Intermediat, eine Eisen-Hydroxy-Spezies. Aus dieser kann durch Aufnahme eines Protons der vollständig oxidierte O-Zustand regeneriert werden.

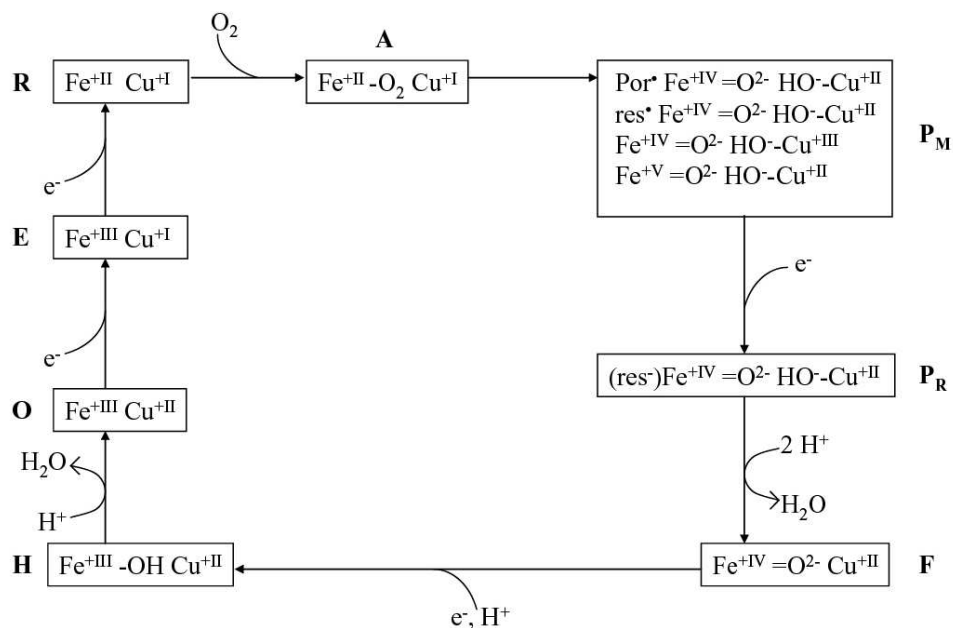
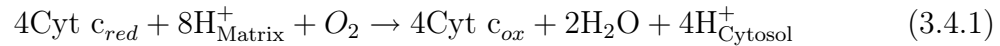


Abbildung 3.4.1: Katalytischer Zyklus der Cytochrom c Oxidase. Dargestellt ist jeweils die Konfiguration des aktiven Zentrums (Häm- a_3 - Cu_B -Zentrum). Für das Intermediat P_M sind alternative Strukturen aufgeführt, die in der aktuellen Forschung diskutiert werden [45].

1977 gelang Wikström der Nachweis, dass bei der Cytochrom c Oxidase zusätz-

lich zu den für die chemische Reaktion der Wasserbildung verbrauchten Protonen noch vier weitere Protonen gepumpt werden [46] [47]. Damit war der Beweis erbracht, dass die Cytochrom c Oxidase eine redoxgetriebene Protonenpumpe ist. Die katalytische Reaktion des Enzyms lässt sich durch folgende Reaktionsgleichung darstellen:



Die Netto-Bilanz eines katalytischen Zyklus der Cytochrom c Oxidase entspricht der Translokation von acht positiven Ladungen von der Matrix heraus auf die cytoplasmatische Seite.

3.4.2 Protonentransferwege in der CcO

An der Oberfläche von Untereinheit II befindet sich eine Anhäufung saurer Aminosäurereste, die zusammen mit einem cytoplasmatischen Teil der Oberfläche von Untereinheit I als Andockstelle für das positiv geladene Substrat Cytochrom c dienen [48] [45]. Die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes erfolgt auf Grund elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den beiden Proteinen [49] [50]. Die Elektronen werden vom Cytochrom c zunächst zu dem konservierten Aminosäurerest Tryptophan 121 übertragen und gelangen dann zum binuklearen Cu_A -Zentrum, welches sich in Untereinheit II befindet. Die Elektronentransferrate zwischen Cytochrom c und Cu_A beträgt 70'000 /s. In [50] wurde gezeigt, dass die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes der geschwindigkeitsbestimmende („rate limiting“) Schritt der katalytischen Reaktion ist. Der nächste Schritt ist der Transfer der Elektronen über eine Distanz von 19,5 Å zum low-spin Häm a in Untereinheit II [48] [51]. Anhand der Röntgenstrukturanalyse wurde ein Elektronentransferweg vorgeschlagen, der unter Einbeziehung des Cu_A -Liganden Histidin-B-224 über 14 kovalente Bindungen, zwei Wasserstoffbrücken, den konservierten Aminosäurerest Arginin 473 und die Häm Propionate verläuft [52]. Von dort können zwei Elektronen nacheinander zum aktiven Zentrum transferiert werden. Das aktive Zentrum ist dann in der Lage, molekularen Sauerstoff zu binden [53] [54]. Durch Mutagenesestudien (u.a. [55] [56]) und anhand der Röntgenkristallstruktur ([52] [57]) der Cytochrom c Oxidase konnten zwei Aufnahmewege für Protonen nachgewiesen werden. Der K-Weg (s. Abbildung 3.4.2) wurde nach der Amino-

3.4 Katalytischer Zyklus der Cytochrom c Oxidase

säure Lysin 354 (K354) benannt.

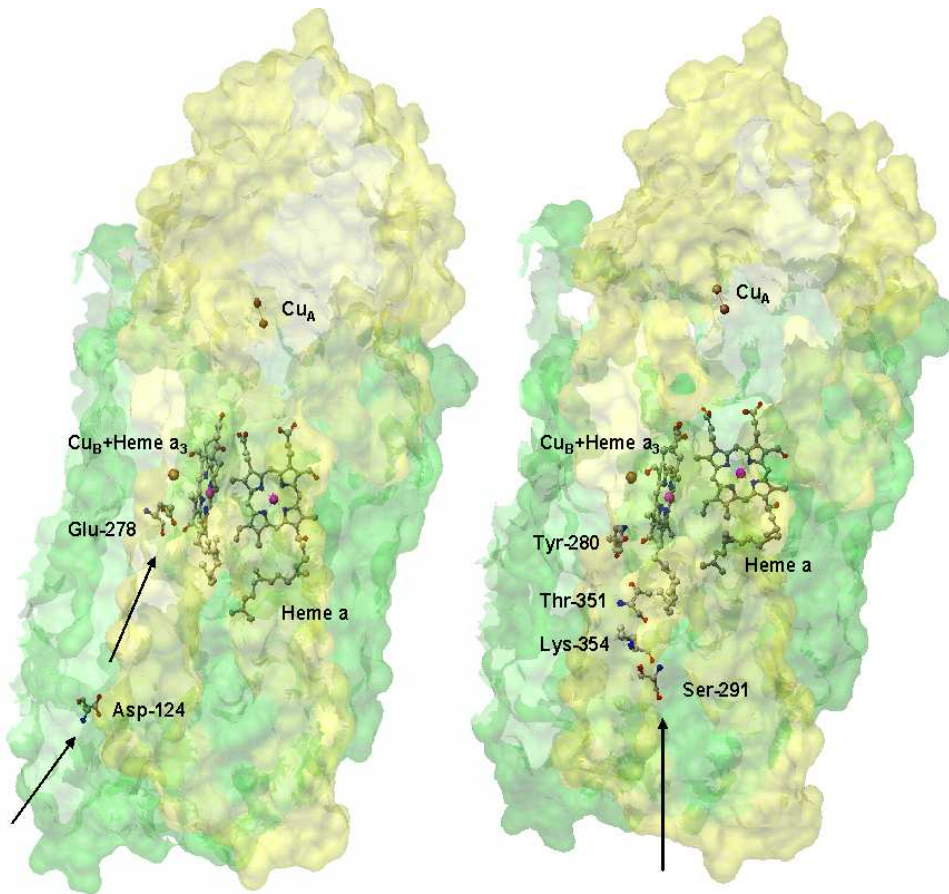


Abbildung 3.4.2: Protonenwege in der Cytochrom c Oxidase, links: D-Weg, rechts: K-Weg. Im K-Weg werden die Protonen über die Aminosäuren Serin 291, Lysin 354, Threonin 351 und Tyrosin 280 zum aktiven Zentrum geleitet. Im D-Weg sind nach der Aminosäure Aspartat 124 etliche weitere Aminosäuren beteiligt. Schließlich gelangen die Protonen zum Glutamat 278, von wo sie entweder zum binuklearen Zentrum oder in Richtung des Protonenausgangsweges dirigiert werden.

Ein Austausch dieser Aminosäure durch Methionin führt zu einem starken Aktivitätsverlust der CcO. Außerdem sind die Aminosäuren Serin 291, Threonin 351 und Tyrosin 280 an der Weiterleitung der Protonen zum aktiven Zentrum beteiligt. Der D-Weg wurde nach der Aminosäure Aspartat 124 (D124) benannt. Der Austausch dieser Aminosäure durch Asparagin führt zum Verlust der Protonenpumpaktivität bei nur leicht verminderter Elektronentransferaktivität. Von D124

führt der Weg über verschiedene Aminosäuren zu der stark konservierten Aminosäure Glutamat 278. Es konnte gezeigt werden [58], dass der P→O-Übergang im katalytischen Zyklus der CcO bei der enzymatisch inaktiven Enzymvariante K345M kaum beeinträchtigt wird. Dies führte zu der Annahme, dass die beiden Protonenaufnahmewege des Enzyms nicht zur räumlichen Trennung der für verschiedene Zwecke verwendeten Protonen dienen, sondern für verschiedene Teilschritte des katalytischen Zyklus verwendet werden. Diese Erkenntnis wirft die Frage auf, wie verhindert wird, dass über den D-Weg aufgenommene Protonen, die gepumpt werden sollen, ins aktive Zentrum gelangen können, dieses aber andererseits zugänglich für die Protonen bleibt, die für die Reduktion des Sauerstoffs benötigt werden. Zur Lösung dieses Problems wurde eine Modellvorstellung entwickelt, bei der die Aminosäure Glutamat 278 eine zentrale Rolle einnimmt. Danach kann die Seitenkette von Glutamat 278 verschiedene Positionen einnehmen und auf diese Weise Protonen einerseits zum aktiven Zentrum und andererseits in Richtung des noch nicht identifizierten Protonenausgangsweges dirigieren [52] [59] [60].

In der Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz wurde ein weiterer Protonenaufnahmeweg postuliert. Der H-Weg wurde nach Histidin 448 benannt. Obwohl viele dem H-Weg zugeordnete Aminosäuren auch in den Cytochrom c Oxidasen von *Paracoccus denitrificans* [61] und *Rhodobacter sphaeroides* konserviert sind, konnte bei den bakteriellen Enzymen keine Beteiligung des H-Weges an der Protonentranslokation nachgewiesen werden [62] [5].

3.4.3 Modelle für den katalytischen Zyklus

1989 veröffentlichte Wikström das erste Kopplungsmodell für den katalytischen Zyklus der Cytochrom c Oxidase [63]. Bei Gleichgewichtstitrationen an Rattenlebermitochondrien in Anwesenheit eines elektrochemischen Gradienten stellte er fest, dass der oxidative Teil des katalytischen Zyklus (der P-F und der F-O-Übergang, s. Abbildung 3.4.1) umkehrbar ist. Daraus folgerte er, dass sämtliche Protonen in diesem Teil des katalytischen Zyklus gepumpt werden müssen (s. Abbildung 3.4.3 (a)).

1998 konnte Michel jedoch nachweisen, dass einige Annahmen Wikströms falsch waren. Er entwickelte ein neues Modell, bei dem jede Elektronenaufnahme mit der Aufnahme eines Protons gekoppelt ist [44]. Eines der vier gepumpten Pro-

3.4 Katalytischer Zyklus der Cytochrom c Oxidase

tonen wird nach dieser Modellvorstellung (s. Abbildung 3.4.3 (b)) im reduktiven Teil (E-R-Übergang) des katalytischen Zyklus transloziert [64].

Wikström und Verkhovsky antworteten darauf mit einem neuen Modell [4] [65]. Nach diesem Modell werden die Hälfte der translozierten Protonen im reduktiven Teil des katalytischen Zyklus gepumpt, *wenn* zuvor der oxidative Teil des Zyklus durchlaufen wurde (s. Abbildung 3.4.3 (c)). Nach Durchlaufen der oxidativen Phase befindet sich das Enzym in einem aktivierten Zustand ($H\sim$), der die für die Sauerstoffreduktion notwendige Energie speichert und in der darauf folgenden reduktiven Phase des Zyklus freisetzt. Dadurch wird die Translokation von zwei Protonen in dieser Phase ermöglicht. Nach diesem Modell wird sämtliche für das Protonenpumpen nötige Energie in der oxidativen Phase gewonnen. Daher steht dieses Modell nicht im Widerspruch zu dem ursprünglich von Wikström vorgestellten Modell.

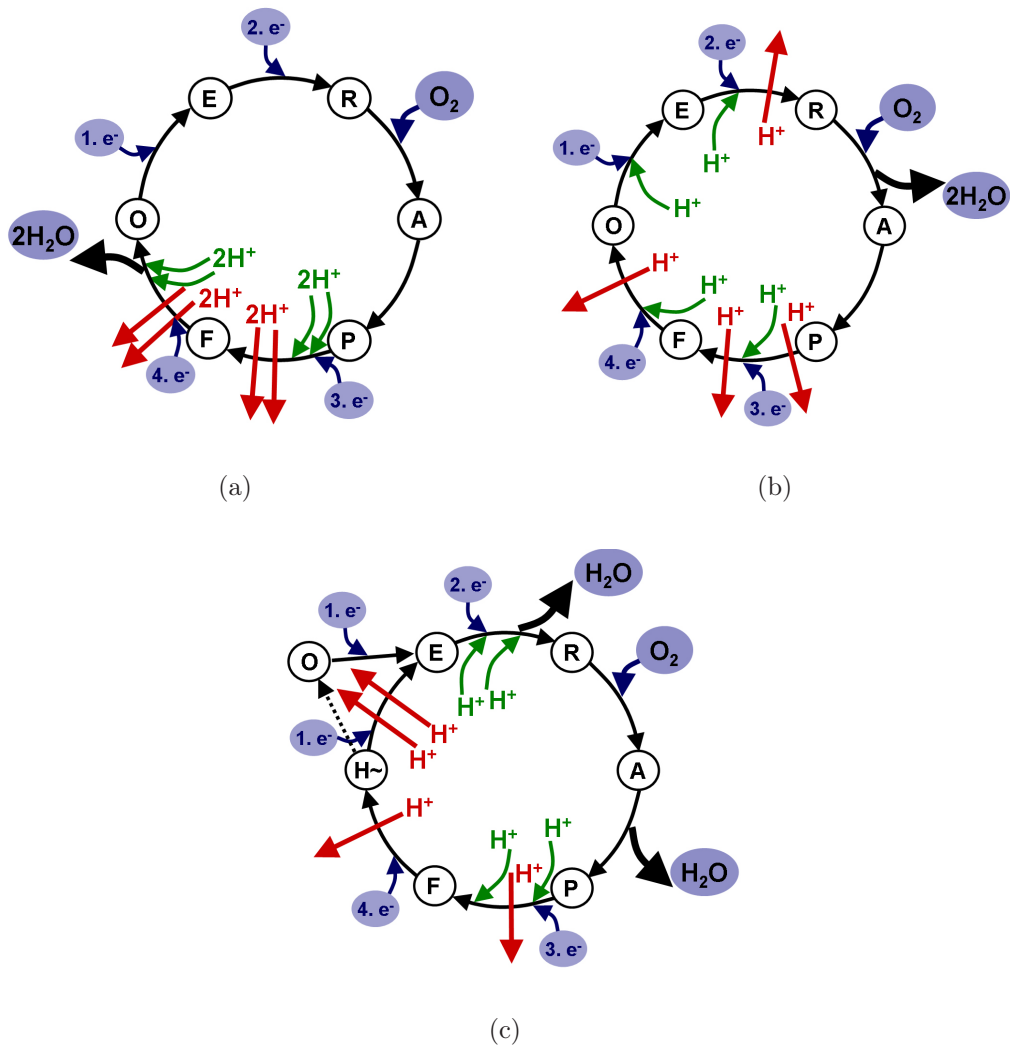


Abbildung 3.4.3: Verschiedene Modelle für den katalytischen Zyklus der Cytochrom c Oxidase: (a) Wikström 1989, (b) Michel 1998, (c) Wikström 2000; rot: gepumpte Protonen, grün: Aufnahme von Substratprotonen. Nähere Erläuterungen s. Text; die Abbildung ist einer Graphik in [66] nachempfunden.

3.5 Die Protein-verankerte Lipid-Membran

Ein zentrales Anliegen aller künstlichen Membransysteme ist der Submembran-Raum. Ein möglichst großes Puffer-Reservoir unter der Membran dient der Aufnahme von Ionen. Zudem ist die Funktionalität insbesondere bei großen Membranproteinen durch ausreichend Platz unter der Membran gewährleistet. Ein Nachteil herkömmlicher tBLM-Systeme ist zum einen, dass zunächst passende lange Spacer-Moleküle gefunden werden müssen, zum anderen die Spacer-Moleküle selbst das Enzym bei seiner Entfaltung behindern und die Funktionalität einschränken können.

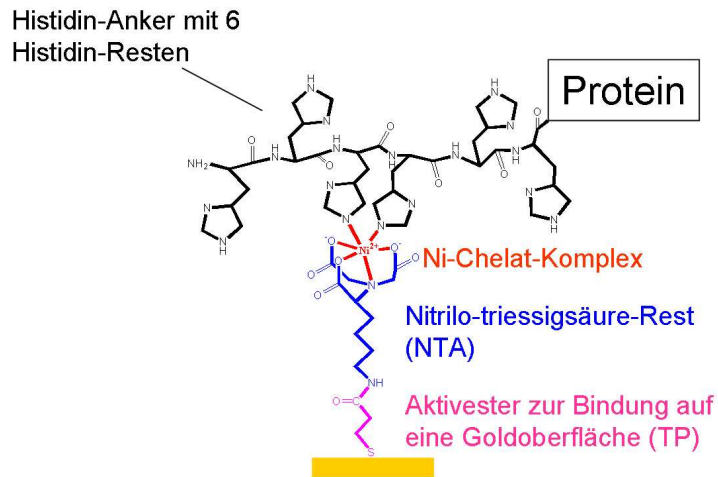
Im Rahmen dieser Arbeit kommt eine neue Methode der Protein-Immobilisierung zum Einsatz, die von unserer Gruppe entwickelt wurde [13]: die Protein-verankerte Lipid-Membran (protein-tethered Lipid Bilayer Membrane, ptBLM). Durch diese Methode können Membranproteine funktionell in eine künstliche Membran inkorporiert werden. Dabei ist das Protein selbst durch eine Ankergruppe an die Oberfläche angebunden. Ausgangspunkt der Methode ist die Möglichkeit, rekombinante Proteine, an die ein Histidin-Anker angefügt wurde, immobilisieren zu können. Der Histidin-Anker (His-Tag) zeigt eine starke Affinität zu Ni^{2+} -Komplexen [67] [68]. Die Immobilisierung mit einem Histidin-Anker auf einer Schicht mit terminalen Ni^{2+} -Komplexen wird standardmäßig zur Aufreinigung der Proteine benutzt, erweist sich aber auch als zuverlässige Methode der Protein-Immobilisierung.

Die Protein-Schicht wird danach mittels Dialyse in eine Lipid-Membran rekonstituiert, wobei Protein-gebundene Detergens-Moleküle durch Lipid-Moleküle ersetzt werden. Dadurch definiert das Protein selbst die Größe des Submembran-Raumes. Ein weiterer deutlicher Vorteil dieses Systems besteht darin, dass Proteine in einer definierten Orientierung immobilisiert werden können, welche durch die Lage des Histidin-Ankers definiert wird. In [13] konnte gezeigt werden, dass die Methode mit dem Protein Cytochrom c Oxidase funktioniert. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wird am Beispiel eines weiteren Proteins, dem bakteriellen photosynthetischen Reaktionszentrum, gezeigt werden, dass die ptBLM-Methode auch auf andere rekombinante Membranproteine mit His-Tag anwendbar ist.

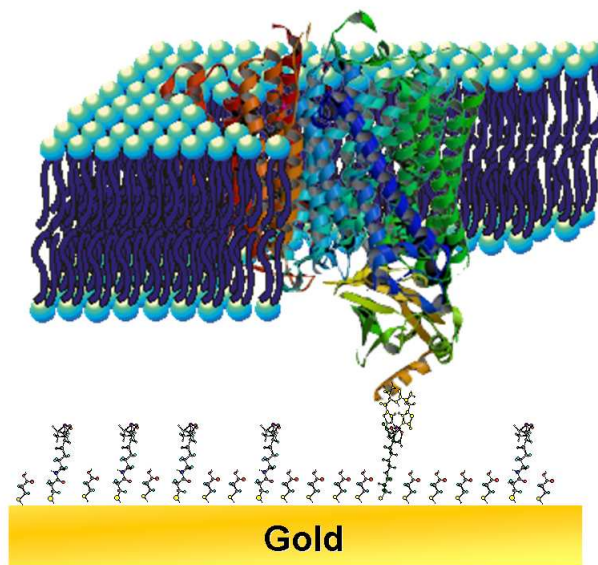
Der Histidin-Anker kann spezifisch an zweiwertige Nickel-Ionen binden. Eine Nickel-Ionen-Lösung wird auf eine Oberfläche mit Nitrilotriessigsäure-(NTA)-Resten gegeben, auf der Ni^{2+} -Ionen gebunden werden und in einem oktaedrischen Komplex an zwei Wassermoleküle gebunden sind. Diese werden durch zwei

Histidin-Reste verdrängt, wodurch ein sehr stabiler Chelat-Komplex entsteht (s. Abbildung 3.5.1). Es hat sich herausgestellt, dass ein Histidin-Anker mit sechs Histidin-Gruppen eine optimale Bindungskinetik aufweist. Die NTA-Gruppen sind über eine Thiopropionatgruppe (TP) auf eine Goldoberfläche angebunden. Wie bereits erwähnt, bietet das ptBLM-System die Möglichkeit, das Protein in einer definierten Orientierung anzubinden. Die Immobilisierung beider Orientierungen ist in Abbildung 3.5.2 dargestellt. Im Falle der Cytochrom c Oxidase kann so einmal das Protein mit der Cytochrom-c-Bindungsstelle zur Elektrode hin orientiert immobilisiert werden („Down-Konfiguration“), zum anderen mit der Cytochrom-c-Bindungsstelle von der Elektrode weg orientiert („Up-Konfiguration“). Im zweiten Fall ist die Cytochrom-c-Bindungsstelle frei zugänglich für Experimente mit Cytochrom c in Lösung. Mit der Down-Konfiguration lassen sich definiert Elektronen in das Protein injizieren (direkter Elektronentransfer). Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung der Kinetik dieses direkten Elektronentransfers und der damit verbundenen Zeitkonstanten für die Oxidoreduktion der einzelnen Redoxzentren mittels zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie.

3.5 Die Protein-verankerte Lipid-Membran



(a)



(b)

Abbildung 3.5.1: Technik der Protein-Immobilisierung mittels eines Histidin-Ankers: (a) Ankerregion, (b) Angebundenes Protein nach Rekonstitution in eine Membran.

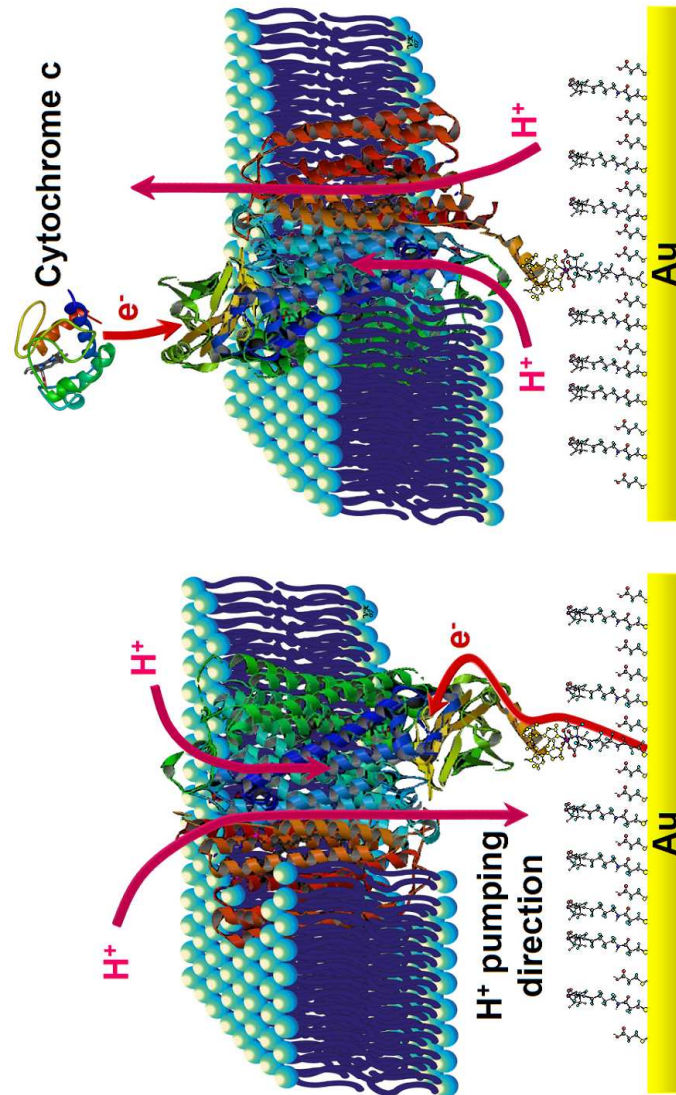


Abbildung 3.5.2: Rekonstituierte Cytochrom c Oxidase mit Cytochrom-c-Bindungsstelle zur Elektrode hin orientiert (links, „Down-Konfiguration“), bzw. von der Elektrode weg orientiert (rechts, „Up-Konfiguration“). Die Ladungstransferwege sind eingezeichnet. In vorliegender Arbeit wird größtenteils die Down-Konfiguration behandelt, angeregt durch den eingezeichneten direkten Elektronentransfer.

3.6 Das bakterielle Reaktionszentrum

Die Photosynthese in den grünen Pflanzen wird von zwei Arten membrangebundener lichtempfindlicher Komplexe durchgeführt, die man als Photosystem I (PS I) und Photosystem II (PS II) bezeichnet. Beide Photosysteme sind komplexe Proteine mit einer Masse von etwa 800 kDa. Photosynthese treibende Bakterien enthalten einen einfacheren, einzelnen Typ eines photosynthetischen Reaktionszentrums, dessen Struktur mit atomarer Auflösung enthüllt wurde. Das Reaktionszentrum besteht aus drei Polypeptidketten: der L-, M-, und H-Untereinheit (31, 36 bzw. 28 kDa) (s. Abbildung 3.6.1). Sequenzvergleiche und mit niedriger Auflösung durchgeführte Strukturuntersuchungen der Photosysteme I und II ergaben, dass das bakterielle Reaktionszentrum homolog zu den komplexeren Systemen der Pflanzen ist, weswegen viele Untersuchungen am bakteriellen Reaktionszentrum auch auf die pflanzliche Photosynthese übertragbar sind. Das in dieser Arbeit untersuchte bakterielle photosynthetische Reaktionszentrum wurde uns von Prof. S. Boxer, Stanford, zur Verfügung gestellt. In [69] ist die Methode beschrieben, wie das Enzym aus dem Bakterium *Rhodobacter Sphaeroides* gewonnen wird.

In [70] ist die Bestimmung der Kristallstruktur des Reaktionszentrums in der besten jemals erzielten Auflösung von 1,87 Å beschrieben. Die entsprechenden Daten sind in der Proteindatenbank PDB unter dem Code 2uxl zugänglich und wurden für die Graphiken des Proteins in dieser Arbeit verwendet [37]. So können auch die genauen Abmessungen des Proteins bestimmt werden: Sie sind in Abbildung 3.6.1 eingezeichnet.

Wie in der Atmungskette auch wird in der Photosynthese ein Protonengradient erzeugt, der die ATP-Synthese antreibt. Die Energie hierfür liefern Photonen, deren Energie von Chlorophyllen bzw. Bakteriopheophytinen absorbiert wird. Bakteriopheophytin ist ein Bakteriochlorophyll, das zwei Protonen anstelle eines Magnesiumions im Zentrum besitzt.

Die Elektronenkette im photosynthetischen bakteriellen Reaktionszentrum (s. Abbildung 3.6.2) Die Absorption von Licht durch ein spezielles Paar (P960) führt zu einem schnellen Transfer eines Elektrons von dieser Stelle zu einem Bakteriopheophytin (BPh) und ruft eine photoinduzierte Ladungstrennung hervor. Die mögliche Rückkehr des Elektrons vom Pheophytin zum oxidierten

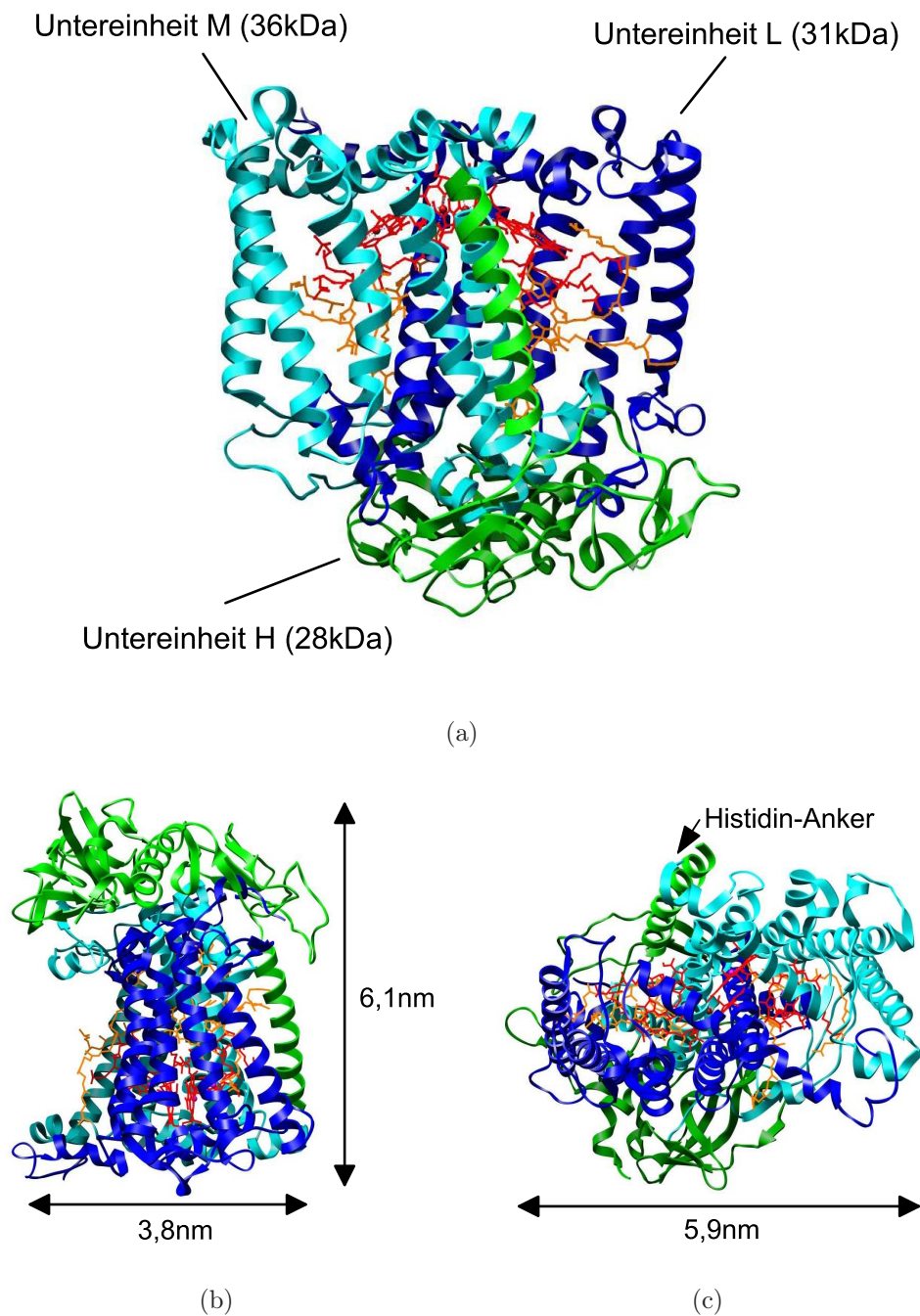


Abbildung 3.6.1: Das bakterielle photosynthetische Reaktionszentrum; (a) und (b) sind Seitenansichten in der Membranebene, (c) ist die Ansicht aus dem Periplasma auf das Enzym. Der Histidin-Anker wird an den C-Terminus von Untereinheit M angefügt.

3.6 Das bakterielle Reaktionszentrum

speziellen Paar wird unterdrückt, indem das „Loch“ im speziellen Paar mit einem Elektron von einem Cytochrom *c* wieder aufgefüllt und das Elektron vom Pheophytin zu einem Chinon (Q_A) transportiert wird, das weiter vom speziellen Paar entfernt ist. Die Reduktion eines Chinons (Q_B) auf der cytoplasmatischen Seite der Membran führt zur Aufnahme von zwei Protonen aus dem Cytoplasma. Das reduzierte Chinon kann sich in den Chinonpool in der Membran bewegen.

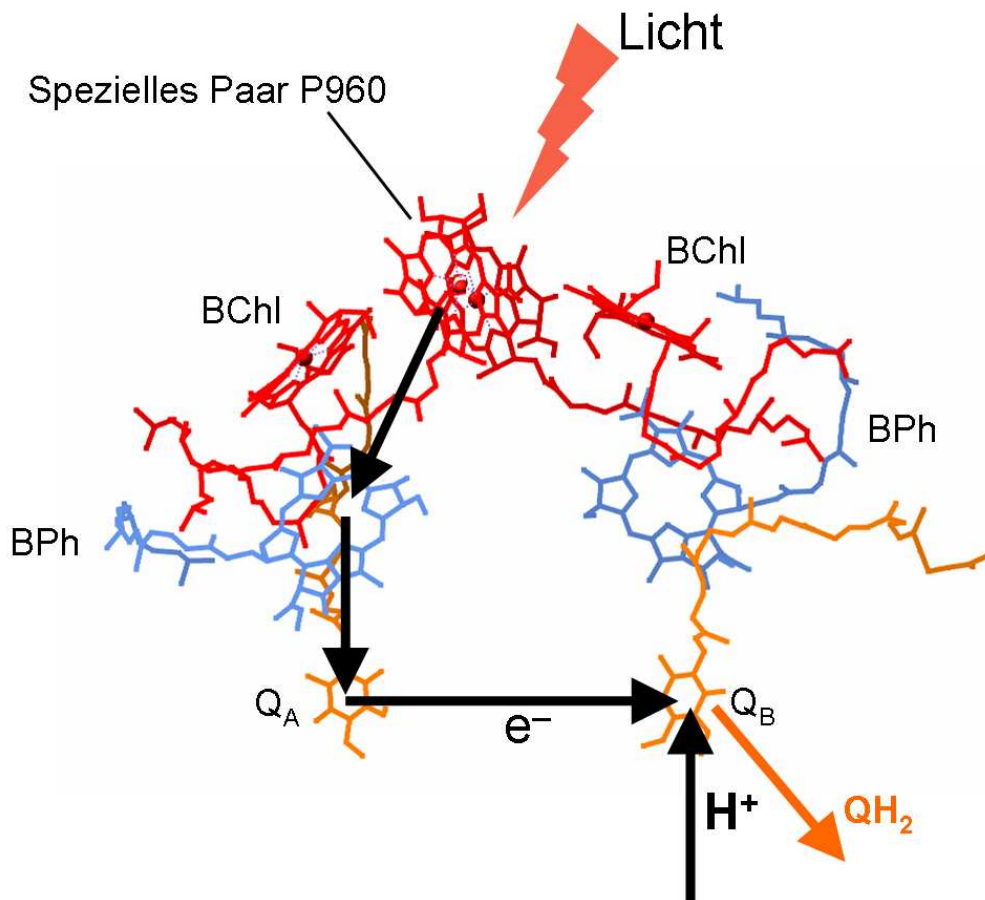


Abbildung 3.6.2: Die prosthetischen Gruppen des Reaktionszentrums. BChl: Bakteriochlorophyll (rot); BPh: Bakteriopheophytin (blau); Q: Chinon (orange). Der Zyklus ist im Text erläutert.

Teil I

Theoretische Grundlagen und Messmethoden

Kapitel 4

Infrarotspektroskopie

4.1 Absorption von Infrarotstrahlung

Das folgende Kapitel basiert auf der Darstellung der Grundlagen der Infrarotspektroskopie in [71].

Die Energie eines Moleküls setzt sich zusammen aus Translationsenergie, Rotationsenergie, Vibrationsenergie und elektronischer Energie. In erster Näherung können diese Energiebeiträge separat betrachtet werden. Elektronische Übergänge zwischen verschiedenen Zuständen führen normalerweise zu Absorption bzw. Emission im ultravioletten und im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums. Reine Rotationsübergänge führen zu Absorption im Mikrowellenbereich und im fernen Infrarot-Bereich. Molekül-Schwingungen schließlich führen zu Absorption fast im gesamten Infrarot-Bereich des Spektrums.

Elektromagnetische Strahlung wird durch ihre Wellenlänge λ , ihre Frequenz ν oder ihre Wellenzahl $\tilde{\nu}$ charakterisiert. Die Wellenzahl in cm^{-1} ist über die Anzahl der Wellen in einem 1 cm langen Wellenzug definiert. Sie ist mit den anderen beiden Größen folgendermaßen verknüpft:

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c} \qquad \tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} \qquad (4.1.1)$$

Hierbei ist c die Lichtgeschwindigkeit. In der Nomenklatur der Infrarotspektroskopie wird meist die Wellenzahl als Messgröße für die Energie der Infrarotstrahlung benutzt, so auch in dieser Arbeit. In Tabelle 4.1.1 sind die Bereiche für die verschiedenen Arten der Infrarotstrahlung (nah, mittel, fern) im elektromagnetischen

Spektrum aufgelistet, zum Vergleich sind auch die benachbarten Strahlungsbereiche aufgelistet. In dieser Arbeit wird mit mittlerer Infrarotstrahlung gearbeitet, weswegen dieser Bereich in der Tabelle markiert ist.

Region	λ / cm	$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$	ν / Hz
Fernes Ultraviolett	$1 \cdot 10^{-6}$ bis $2 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^6$ bis 50'000	$3 \cdot 10^{16}$ bis $1,5 \cdot 10^{15}$
Nahes Ultraviolett	$2 \cdot 10^{-5}$ bis $3,8 \cdot 10^{-5}$	50'000 bis 26'300	$1,5 \cdot 10^{15}$ bis $7,9 \cdot 10^{14}$
Sichtbar	$3,8 \cdot 10^{-5}$ bis $7,8 \cdot 10^{-5}$	26'300 bis 12'800	$7,9 \cdot 10^{14}$ bis $3,8 \cdot 10^{14}$
Nahes Infrarot	$7,8 \cdot 10^{-5}$ bis $2,5 \cdot 10^{-4}$	12'800 bis 4'000	$3,8 \cdot 10^{14}$ bis $1,2 \cdot 10^{14}$
Mittleres Infrarot	$2,5 \cdot 10^{-4}$ bis $5 \cdot 10^{-3}$	4000 bis 200	$1,2 \cdot 10^{14}$ bis $6 \cdot 10^{12}$
Fernes Infrarot	$5 \cdot 10^{-3}$ bis $1 \cdot 10^{-1}$	200 bis 10	$6 \cdot 10^{12}$ bis $3 \cdot 10^{11}$
Mikrowellen	$1 \cdot 10^{-1}$ bis $1 \cdot 10^2$	10 bis 0,01	$1 \cdot 10^{12}$ bis $3 \cdot 10^8$

Tabelle 4.1.1: Bereiche des elektromagnetischen Spektrums und Zahlenwerte für verschiedene Einheiten im Vergleich. Der Standard-Nomenklatur folgend wird in dieser Arbeit die Einheit Wellenzahl ($\tilde{\nu}$) benutzt. Die in dieser Arbeit auftretenden Wellenzahlen bewegen sich im Bereich der mittleren Infrarotstrahlung, dieser Bereich ist rot markiert.

4.1.1 Freiheitsgrade eines Moleküls und Eigenmoden der Molekülschwingungen

Im klassischen Modell kann ein Molekül durch Massepunkte dargestellt werden, die durch masselose Federn zusammengehalten werden, welche die Kräfte repräsentieren, die die Atome im Molekül zusammenhalten. Sie haben das Bestreben, die Bindungslängen und -winkel konstant zu halten bzw. nach einer Störung den Ausgangszustand wiederherzustellen. Jeder Massepunkt wird durch drei Koordinaten, x , y und z , beschrieben, die seine Position definieren. Jeder Massepunkt

4.1 Absorption von Infrarotstrahlung

hat daher 3 unabhängige Freiheitsgrade. In einem Molekül, welches aus N Atomen besteht, gibt es insgesamt $3N$ Freiheitsgrade der Bewegung für alle Massepunkte im Molekül. Der Schwerpunkt des Moleküls benötigt 3 Koordinaten, um seine Position zu definieren. Dazu kommen für ein nichtlineares Molekül noch einmal 3 Freiheitsgrade der Rotation, durch welche die Orientierung des Moleküls im Raum beschrieben wird. Für ein lineares Molekül sind hierzu 2 Freiheitsgrade ausreichend. Nach Abzug der Freiheitsgrade für Translation und Rotation bleiben noch $3N-6$ interne Freiheitsgrade für ein nichtlineares Molekül und $3N-5$ interne Freiheitsgrade für ein lineares Molekül übrig.

Die $3N-6$ internen Bewegungs-Freiheitsgrade eines nichtlinearen Moleküls entsprechen $3N-6$ unabhängigen Schwingungs-Eigenmoden. In jeder Schwingungs-Eigenmode schwingen alle Atome im Molekül mit derselben Frequenz und alle Atome durchqueren gleichzeitig ihre Ruhelage. Sind die Kräfte, die das Molekül zusammenhalten, Linearfunktionen der Auslenkungen der Atome von ihren Ruhelagen, so ist die Molekülschwingung *harmonisch*. In diesem Fall bewegen sich die Atome in Form von harmonischen Schwingungen um ihre Ruhelagen.

4.1.2 Klassische Behandlung der Schwingung eines zweiatomigen Moleküls

Ein zweiatomiges Molekül sei durch die Massen m_1 und m_2 gegeben, die durch eine masselose Feder miteinander verbunden sind (s. Abbildung 4.1.1).

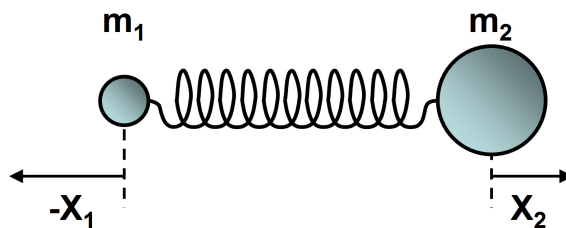


Abbildung 4.1.1: Zweiatomiges Molekül-Modell mit unterschiedlichen Massen. Die interatomare Kraft, die das Molekül zusammenhält, wird durch eine masselose Feder repräsentiert.

Der Einfachheit halber sei eine Bewegung der Massen nur entlang der moleku-

laren Achse erlaubt. Die Auslenkung der Massen von ihren Ruhelagen sei X_1 und X_2 . $(X_2 - X_1)$ ist dann die Strecke, um die die Bindungslänge von der Gleichgewichtslänge abweicht. Die Feder unterliege Hook's Gesetz, d.h. bei einer Auslenkung der Massen ist die rücktreibende Kraft proportional der Auslenkung mal einer Konstanten F . Die Bewegungsgleichungen $Fx = -m\ddot{x}$ lauten dann:

$$F(X_2 - X_1) = m_1 \frac{d^2 X_1}{dt^2} \quad \text{und} \quad -F(X_2 - X_1) = m_2 \frac{d^2 X_2}{dt^2} \quad (4.1.2)$$

Die Lösungen dieser Differenzialgleichungen lauten

$$X_1 = A_1 \cos(2\pi\nu t + \alpha) \quad \text{und} \quad X_2 = A_2 \cos(2\pi\nu t + \alpha), \quad (4.1.3)$$

wodurch einfache harmonische Schwingungen für beide Massen beschrieben werden. A_1 und A_2 sind die Amplituden der Auslenkungen. Zweimaliges Differenzieren von Gleichung 4.1.3 und Einsetzen der Werte von X_1 und X_2 sowie deren zweite Ableitungen in Gleichung 4.1.2 liefert (nach Kürzen der Kosinus-Funktionen)

$$F(A_2 - A_1) = -m_1 A_1 4\pi^2 \nu^2 \quad \text{und} \quad F(A_2 - A_1) = m_2 A_2 4\pi^2 \nu^2 \quad (4.1.4)$$

Aus diesen beiden Gleichungen lässt sich die Schwingungsfrequenz ν ermitteln:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{F \left(\frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \right)} \quad (4.1.5)$$

Unter Benutzung des Ausdrucks

$$u = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

für die reduzierte Masse kann Gleichung 4.1.5 auch folgendermaßen formuliert werden:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{F}{u}} \quad (4.1.6)$$

Aus Gleichung 4.1.5 bzw. 4.1.6 folgt, dass die Schwingungsfrequenz unabhängig von der Schwingungsamplitude ist.

4.1 Absorption von Infrarotstrahlung

Bei bekannter Schwingungsfrequenz und bekannten Massen kann die Kraftkonstante berechnet werden:

$$F = 4\pi^2\nu^2u \quad (4.1.7)$$

Die Energie des klassischen harmonischen Oszillators ist

$$E_{vib} = \frac{1}{2}FX_{max}^2 \quad (4.1.8)$$

mit der maximalen Auslenkung $X_2 - X_1 = X_{max}$

4.1.3 Quantenmechanische Beschreibung der Molekülschwingung

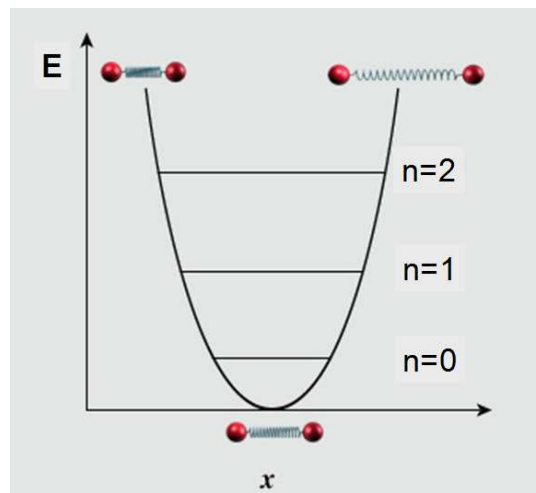


Abbildung 4.1.2: Quantisierte Energie-Eigenzustände des harmonischen Oszillators.

In der quantenmechanischen Betrachtung des harmonischen Oszillators erhält man für die Energiezustände den quantisierten Ausdruck

$$E_{vib} = \left(n + \frac{1}{2}\right)h\nu \quad (4.1.9)$$

Dabei ist h die Planck-Konstante und n die Quantenzahl, die positive ganze Zahlen annehmen kann (0,1,2,...). Für $n=0$ befindet sich das Molekül im Grund-

zustand. In Abbildung 4.1.2 sind die quantisierten Energiezustände im harmonischen Oszillator eingezeichnet. Die meisten Infrarot-Anregungen finden zwischen dem Grundzustand und dem ersten angeregten Zustand statt ($n=0 \rightarrow n=1$). Die Auswahlregel für die Schwingungs-Quantenzahl n besagt, dass diese bei einem Übergang entweder um eins zunehmen oder um eins abnehmen muss:

$$\Delta n = \pm 1 \quad (4.1.10)$$

Das bedeutet, dass sich die Quantenzahl der harmonischen Schwingung bei einer Wechselwirkung mit einem elektromagnetischen Feld in jedem Fall um $\Delta n = 1$ ändern muss, $\Delta n > 1$ ist nicht möglich ¹ Für Rotationsübergänge gilt

$$E_{rot} = \frac{\ell(\ell + 1)\hbar^2}{2uX^2} \quad (4.1.11)$$

Hierbei ist ℓ die Bahndrehimpuls-Quantenzahl und $\hbar = h/2\pi$. Die Energie eines Vibrationsübergangs eines Moleküls ist typischerweise etwa 100-mal größer als die Energie eines Rotationsübergangs. Bei den Rotationsübergängen treten stets Übergänge zwischen verschiedenen Quantenzahlen auf, also nicht nur $\ell=0 \rightarrow \ell=1$, sondern auch $\ell=1 \rightarrow \ell=2$, $\ell=2 \rightarrow \ell=3$ etc. Für die Bahndrehimpulsquantenzahl gilt im Übrigen die gleiche Auswahlregel wie für die Quantenzahl des harmonischen Oszillators:

$$\Delta \ell = \pm 1 \quad (4.1.12)$$

Mit der Absorption von Infrarot-Strahlung ist eine Änderung des Dipolmomentes des Moleküls verbunden. Dabei gilt

$$I_{IR} \propto \left| \frac{\partial \mu}{\partial Q} \right|^2 \cos^2 \theta \quad (4.1.13)$$

Die Intensität einer Bande ist proportional zum Quadrat der Änderung des Dipolmomentes der entsprechenden Bindung in Richtung der Normalkomponente. Das Dipolmoment kann entweder statisch sein, d.h. das Molekül hat immer ein Dipolmoment (wie z.B. H₂O), oder das Dipolmoment tritt temporär während der Wechselwirkung mit dem elektromagnetischen Strahlungsfeld auf (wie z.B. CO₂). Die hier angeführten Grundlagen der Infrarot-Spektroskopie wurden für den sehr

¹Bei nicht-harmonischen Oszillatoren sind auch Änderungen der Quantenzahl >1 erlaubt.

4.1 Absorption von Infrarotstrahlung

einfachen Fall eines linearen zweiatomigen Moleküls gemacht, für das es nur $3N-5=1$ Schwingungsmoden gibt. Im Falle eines dreiatomigen nichtlinearen Moleküls gibt es bereits $3N-6=3$ verschiedene unabhängige Schwingungsmoden: die symmetrische und die asymmetrische Streckschwingung sowie die Biegeschwingung (s. Abbildung 4.1.3).

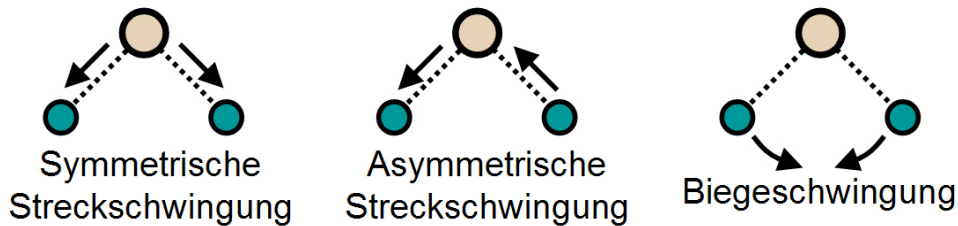


Abbildung 4.1.3: Unabhängige Schwingungsmoden eines dreiatomigen nichtlinearen Moleküls

Für komplexere Moleküle steigt der Aufwand in der Berechnung der Schwingungsmoden enorm an und empirische Methoden kommen zum Einsatz. Es zeigt sich, dass bestimmte sub-molekulare Gruppen von Atomen charakteristische Banden im Absorptionsspektrum produzieren, die für alle Moleküle einer bestimmten Klasse gleich sind. Sie werden Gruppenschwingungen genannt. Bestimmte Gruppenfrequenzen (Schwingungsmoden von CH_3 und CH_2) sind z.B. in Abbildung 4.1.4 eingezeichnet. In Spektren von Proteinen tauchen stets charakteristische Amid-Banden auf, die vom Peptid-Gerüst stammen (s. Abschnitt 4.1.4). Zusätzlich treten sog. „Fingerprint“-Regionen auf, die charakteristisch für ein ganz bestimmtes Molekül sind (z.B. bestimmte Aminosäure-Seitenketten in Proteinen). Hinzu kommen Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Gruppen, so dass das Infrarotspektrum einer Verbindung oft sehr komplex ist. Andererseits ist es auch sehr charakteristisch für genau diese Spezies, was die Infrarotspektroskopie so wichtig für den Nachweis chemischer Substanzen macht.

4.1.4 Infrarotspektroskopie an Proteinen

Wie bereits erwähnt, kann eine bestimmte Gruppenfrequenz durch inter- und intramolekulare Effekte beeinflusst werden. Intramolekulare Effekte, welche die

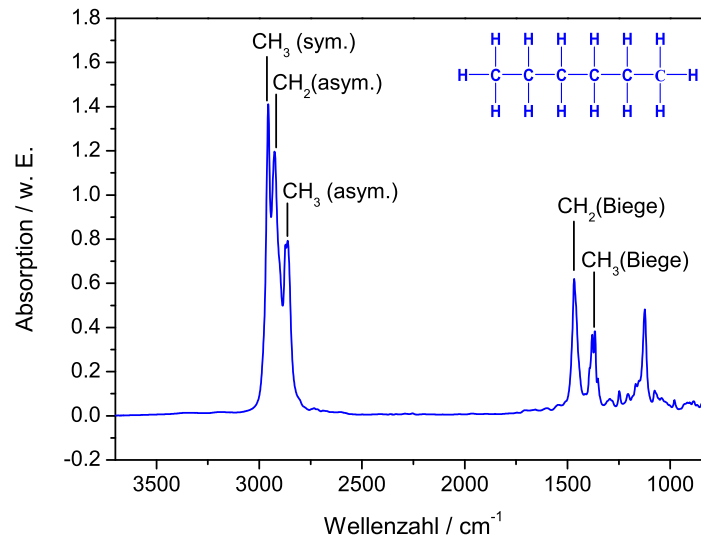


Abbildung 4.1.4: Infrarot-Absorptionsspektrum von Hexan. Es wird deutlich, dass bei einem komplexeren Molekül als bei dem zweiatomigen Beispiel-Molekül, an dem die Rechnungen angestellt wurden, komplexe Spektren entstehen.

Gruppenfrequenzen beeinflussen, beinhalten Atommassen benachbarter Gruppen, mechanische Kopplung zwischen ähnlichen Gruppen, Symmetrie-Effekte, Elektronegativität, Konjugation etc. Unter den intermolekularen Effekten spielt die Wasserstoffbrücken-Bildung eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung von Gruppenfrequenzen. Die Wasserstoffbrücken stabilisieren biologische Moleküle, beispielsweise bei der Bildung von α -Helices oder β -Faltblättern und stellen damit eine intramolekulare Kraft dar. Gleichzeitig stellen sie aber auch den größten Effekt bei der Beeinflussung der Gruppenfrequenzen als intermolekulare Wechselwirkung dar. Stark beeinflusst durch Wasserstoffbrücken-Bildung werden z.B. Streckschwingungen von Donator-Gruppen, deren Schwingungsfrequenz dadurch um mehrere hundert Wellenzahlen verschoben werden kann [72]. Die Akzeptor-Gruppe, z.B. $\text{C}=\text{O}$, wird hingegen nur schwach beeinflusst, und es tritt eine Verschiebung zu niedrigeren Wellenzahlen von $5\text{-}25\text{ cm}^{-1}$ auf. Für Biegeschwingungen ist die Störung durch Wasserstoffbrücken-Bildung meist weniger stark ausgeprägt und die Verschiebung der Wellenzahl erfolgt meist zu höheren Werten [73].

Das Infrarot-Spektrum eines komplexen Moleküls, wie einem Protein, ist aus al-

4.1 Absorption von Infrarotstrahlung

len infrarot-aktiven molekularen Bindungen im Molekül zusammengesetzt. All diese Faktoren führen zu einem dem Protein eigenen Spektrum, in dem die Information über das Protein enthalten ist. Die Form der Banden ist ein Maß für die Gesamtzahl an Molekülen, die Schwingungsmoden beisteuern. Die Bandenform liefert außerdem Informationen über lokale molekulare Wechselwirkungen. In einem Gas unter sehr niedrigem Druck ist die Bandenform meist Gauß-förmig. Unter höherem Druck und in verdünnten Lösungen mit nicht-wechselwirkendem Lösungsmittel werden Lorentz-förmige Banden beobachtet. Lösungen in polaren Lösungsmitteln (wie Wasser) oder Feststoffe zeigen oft Abweichungen von der Lorentz-Bandenform. Die Banden sind breiter in der Nähe der Peakspitze und schmaler an der Basis. Sie können durch das Voigt-Profil beschrieben werden, welches eine Faltung aus Lorentz- und Gaußprofil ist [74] (s. Abbildung 4.1.5). Die entsprechenden Formeln sind durch die Gleichungen 4.1.14 (Gauß-Profil), 4.1.15 (Lorentz-Profil) und 4.1.16 (Voigt-Profil) gegeben.

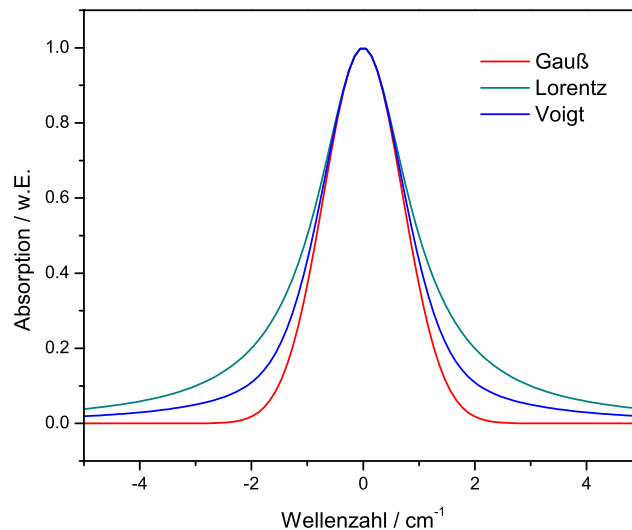


Abbildung 4.1.5: Verschiedene Linienprofile für Infrarotbanden. Das Voigt-Profil ist eine Faltung aus Gauß- und Lorentz-Profil.

$$G(x) = \frac{e^{-x^2/(2\sigma^2)}}{\sigma\sqrt{2\pi}} \quad (4.1.14)$$

$$L(x) = \frac{\gamma}{\pi(x^2 + \gamma^2)} \quad (4.1.15)$$

$$V(x) = (G * L)(x) = \int G(\tau)L(x - \tau)d\tau \quad (4.1.16)$$

σ ist die Standardabweichung der Gauß-Verteilung und γ ist die halbe Halbwertsbreite der Lorentzverteilung, auch als Druckverbreiterung bekannt.

4.1.4.1 Schwingungen der CONH-Gruppe des Polypeptid-Gerüsts

Die Infrarotspektren von Polypeptiden und Proteinen beinhalten mehrere starke Absorptionsbanden, die von den Peptidbindungen stammen. Jede dieser Peptidbindungen steht für eine CONH-Gruppe. Die charakteristischen Banden der CONH-Gruppe werden Amid-Banden genannt. Insgesamt sind 9 Amid-Banden universell anerkannt (s. Tabelle 4.1.2).

In [20] ist die Entwicklung eines Schwingungs-Kraftfeldes für Polypeptidketten beschrieben. Dabei wurde zunächst ein Kraftfeld² des Moleküls N-Methylacetamid berechnet [75] [76]. Darauf aufbauend wurden mit Hilfe von Berechnungen an Polypeptid-Strukturen wie Polyglycin I, β -Poly(L-Alanin) und α -Poly(L-Alanin) Schwingungs-Kraftfelder für diese Strukturen entwickelt. Die berechneten Spektren weichen in der Regel um weniger als 5 cm^{-1} von den beobachteten Spektren ab [77]. Die berechneten Kraftfelder werden als Basis für die strukturelle Analyse anderer Polypeptid-Moleküle benutzt.

Wie bereits erwähnt, wurden in [20] (Krimm et al.) die Schwingungsmoden des Moleküls N-Methylacetamid (s. Abbildung 4.1.6) mit Hilfe eines Näherungs-Algorithmus berechnet.

Auf der Basis dieser und weiterer Rechnungen [21] wurden Frequenzen für die verschiedenen Amid-Banden berechnet. Sie sind in Tabelle 4.1.2 eingetragen. Zu den meisten Banden tragen mehrere der 8 Schwingungs-Moden bei. Die 8 Moden

²Abweichend von der allgemeinen Bedeutung des Wortes Kraftfeld in der Physik bezeichnet in der Molekülphysik Kraftfeld (engl. force field) einen Satz vollständiger Kraftkonstanten eines Moleküls einschließlich aller Wechselwirkungskraftkonstanten.

4.1 Absorption von Infrarotstrahlung

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
	Amid III	1300	CN_s (40%), NH_{ib} (30%), CC_s (20%), CO_{ib}
Out-of-plane (aus der Ebene heraus)	Amid V	725	NH_{ob} , CN_t
	Amid IV	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}

Tabelle 4.1.2: Berechnete Amid-Banden nach [20] und [21] mit prozentualer Beteiligung der Amid-Schwingungsmoden. s: Streckschwingung; d: Deformationsschwingung; T: Torsionsschwingung; ib: in-plane bend (Biegeschwingung in der Ebene); ob: out-of-plane bend (Biegeschwingung aus der Ebene heraus); CC_s : Methyl-C-Streckschwingung

sind in Tabelle 4.1.3 eingetragen.

In frühen Arbeiten über Infrarot-Schwingungen von Polypeptiden wurden charakteristische Banden bei 1650 cm^{-1} und 1550 cm^{-1} mit den Konformationen dieser Polypeptide in Verbindung gebracht [78]. Wird eine Kette unendlicher Länge angenommen [21] [79], so lässt sich eine allgemeine Gleichung für die Schwingungsfrequenzen herleiten, wobei Störungs-Theorie erster Ordnung verwendet wird:

$$\nu(\delta, \delta') = \nu_0 + \sum_j D_j \cos(j\delta) + \sum_j D'_j \cos(j\delta') \quad (4.1.17)$$

Der erste Term ν_0 ist die ungestörte Frequenz der isolierten Amid-Gruppe, D_j ist die Kopplungskonstante zwischen der Referenz-Amid-Gruppe und der j-ten Gruppe der Kette. δ bezeichnet die Phasendifferenz zwischen korrespondierenden Atom-Bewegungen aufeinander folgender Gruppen. Die genannten Parameter beschreiben die Wechselwirkungen in derselben Kette, wohingegen D'_j und δ' die Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Ketten beschreiben. Gleichung

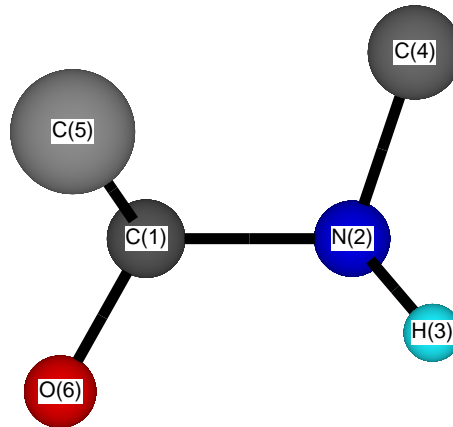


Abbildung 4.1.6: Modell der Methylacetamid-Gruppe

Symmetrie	Schwingungsmode
In-plane (in der Ebene)	C=O-Streckschwingung
	C-N-Streckschwingung
	N-H-Streckschwingung
	OCN-Biegeschwingung
	CNH-Biegeschwingung
Out-of-plane (aus der Ebene heraus)	C-N-Torsionsschwingung
	C=O-Biegeschwingung
	N-H-Biegeschwingung

Tabelle 4.1.3: Die 8 verschiedenen Schwingungsmoden der CONH-(N-Methylacetamid-) Gruppe

chung 4.1.17 kann angewendet werden, um die Infrarot-Schwingungen der Peptid-Bindungen zu berechnen [80] [81] [20].

4.1.4.2 Einfluss der Sekundärstrukturtypen auf die Lage der Amid-Banden

Die genaue Lage der Amid-Banden wird auch durch die Sekundärstruktur des Proteins bestimmt [72] [82]. Tabelle 4.1.4 gibt eine Zusammenstellung von Sekundärstrukturen mit den entsprechenden Wellenzahlen für die Amid I-, II- und III-Bande wieder.

4.1 Absorption von Infrarotstrahlung

Sekundär- strukturtyp	$\tilde{\nu}(\text{Amid I}) /$ cm^{-1}	$\tilde{\nu}(\text{Amid II}) /$ cm^{-1}	$\tilde{\nu}(\text{Amid III}) /$ cm^{-1}
α -Helix	1648-1655	1545-1550	1260-1290
Random	1656-1660	1520 od. 1535	nicht bekannt
β -paralleles + β -antiparalleles Faltblatt	1630-1636	1520-1530	1235
β -turn	1660-1671	nicht bekannt	nicht bekannt

Tabelle 4.1.4: Zuordnung von Wellenzahlen der Amid I-, II- und III-Bande zu Sekundärstrukturen von Proteinen nach [72] [82].

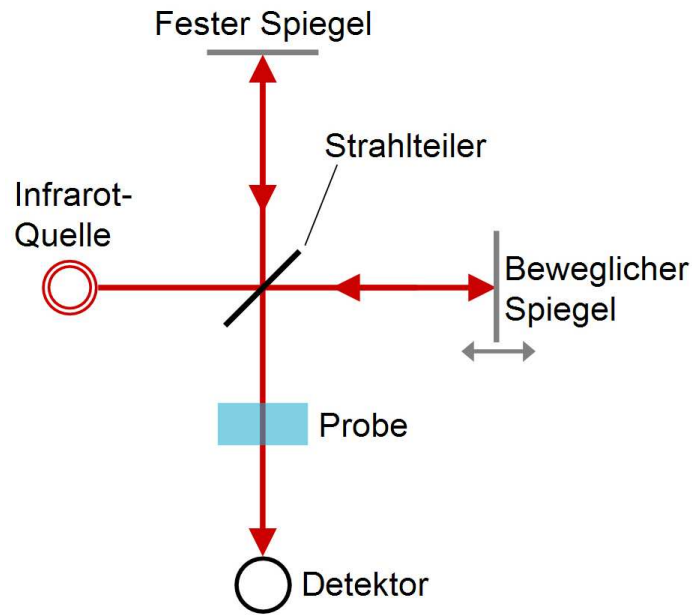
4.2 FTIR-Spektroskopie

4.2.1 Grundlagen der FTIR-Absorptions-Spektroskopie

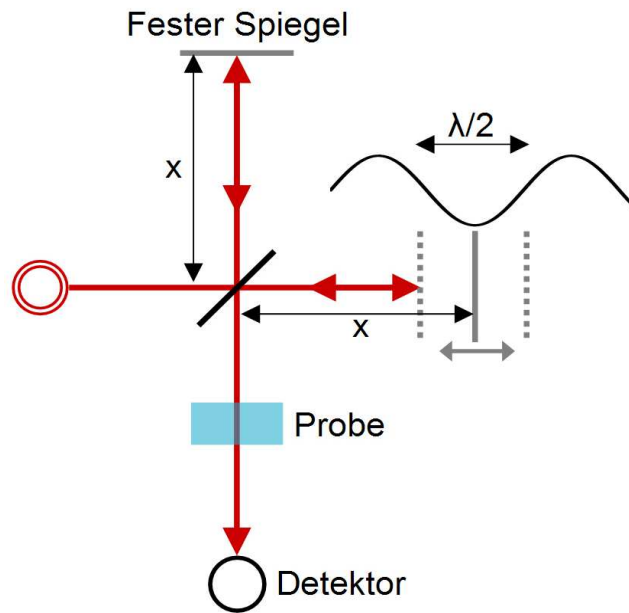
Konventionelle dispersive Infrarot-Spektrometer bestanden aus einer Infrarot-Quelle, die auf die Probe fokussiert war. Der Infrarotstrahl wurde mittels eines Gitters oder eines Prismas gestreut und durch einen Schlitz wurde ein kleiner Frequenzbereich durchgelassen. Um ein komplettes Frequenzspektrum zu erhalten, musste demnach der Einfallswinkel des gebrochenen Strahls sukzessive variiert werden. Zu einer bestimmten Zeit konnte daher nur ein Frequenzbereich innerhalb der spektralen Auflösung gemessen werden. Es ist offensichtlich, dass diese Methode langsam war. Zudem konnte immer nur ein kleiner Teil der Strahlintensität genutzt werden. Ein großer Fortschritt war daher die Einführung des Michelson-Interferometers in IR-Spektrometern. Das erste mit einem Michelson-Interferometer gemessene IR-Spektrum wurde 1956 von Gebbie und Vanesse veröffentlicht [83]. Ab den 1960er-Jahren wurde diese Technik zunehmend genutzt, wozu auch die Entwicklung des Fast-Fouriertransformations-Algorithmus entscheidend beitrug [84].

Ein FTIR-Spektrometer produziert einen Infrarot-Strahl aus zwei interferierenden Teilstrahlen, die dann auf die zu untersuchende Probe treffen. Das Prinzip ist in Abbildung 4.2.1 dargestellt.

Der aus der Infrarot-Quelle emittierte Strahl wird durch den Strahlteiler in zwei Teilstrahlen mit je halber Intensität geteilt. Der eine Teilstrahl wird durch einen festen Spiegel (oben) nach unten reflektiert und passiert den Strahlteiler. Der zweite Teilstrahl passiert erst den Strahlteiler, wird dann vom beweglichen Spiegel (rechts) und dann vom Strahlteiler nach unten reflektiert. Unter dem Strahlteiler vereinigen sich die beiden Teilstrahlen wieder und passieren dann die Probe (Im Falle einer Referenzmessung wird die Probe entfernt). Nach Durchgang durch die Probe trifft der Strahl auf den Detektor, wo die Intensität gemessen wird. Der bewegliche Spiegel wird kontinuierlich hin- und hergefahren, so dass die Intensität des Gesamtstrahls beim Erreichen der Probe ständig variiert. Betrachtet man das Michelson-Interferometer zunächst für eine ganz bestimmte Frequenz, so wird die Funktionsweise deutlich: wenn die beiden Spiegel gleich weit vom Strahlteiler entfernt sind (in Abbildung 4.2.1 (b) die Strecke x), so kommt es zur konstruktiven Interferenz der beiden Teilstrahlen. Verschiebt sich dann der



(a)



(b)

Abbildung 4.2.1: Schematische Darstellung des Michelson-Interferometers. (a) Komponenten (b) Funktionsweise. Die Funktionsweise ist im Text erläutert

bewegliche Spiegel um die Distanz $\lambda/4$ nach rechts oder links, so beträgt der Wegunterschied zwischen den beiden Teilstrahlen $\lambda/2$, da man den Weg zwischen Strahlteiler und Spiegel doppelt zählen muss. Bei einem Wegunterschied von $\lambda/2$ kommt es zu destruktiver Interferenz (Auslöschung) und es kommt keine Intensität an der Probe bzw. am Detektor an. Im Interferogramm (Abbildung 4.2.2) ist die Intensität des Strahls nach Interferenz der Teilstrahlen in Abhängigkeit von der Verschiebung des beweglichen Spiegels von der Nulllage (die Retardierung δ als optischer Wegunterschied zwischen festem und beweglichem Spiegel ist das Doppelte davon) aufgetragen. Die Nulllage ist dabei die Position, bei der beide Spiegel gleichweit vom Strahlteiler entfernt sind. Bei Null weist das Interferogramm maximale Intensität auf (diese Stelle wird „center burst“ genannt), da alle Wellenlängen konstruktiv interferieren. Die Intensität an jeder anderen beliebigen Position des Interferogramms ist eine komplizierte Überlagerung aus interferierenden Wellenlängen.

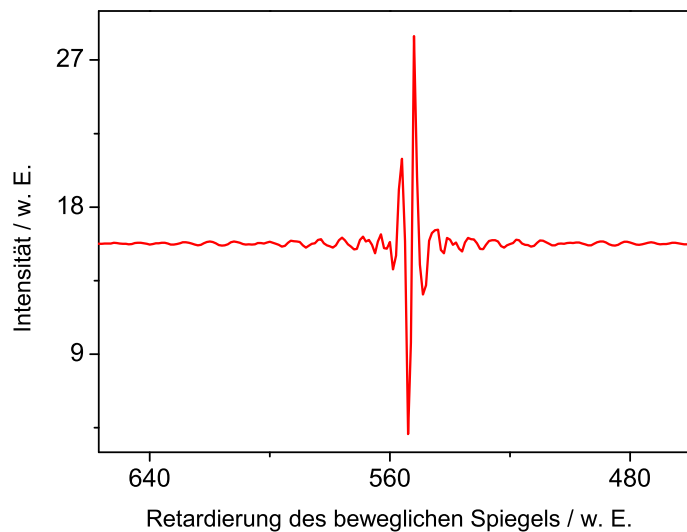


Abbildung 4.2.2: Interferogramm eines FTIR-Spektrometers

Im Interferogramm ist alle Information über die Absorption durch eine Probe enthalten. Die Retardierung des beweglichen Spiegels stellt eine Ortsinformation dar, die durch Fourier-Transformation in eine Energie-Information bzw. Frequenz- oder Wellenzahl-Information umgerechnet wird. So erhält man die absolute Intensitätsverteilung der Infrarotstrahlung in Abhängigkeit von der Wellenzahl. Der

4.2 FTIR-Spektroskopie

AC-Anteil der Intensität des Interferogramms berechnet sich zu [85]

$$I^{AC}(\delta) = \int_0^{+\infty} B(\tilde{\nu}) \cos 2\pi\tilde{\nu}\delta \cdot d\tilde{\nu} \quad (4.2.1)$$

Dabei ist δ die Retardierung und $B(\tilde{\nu})$ ist definiert über

$$B(\tilde{\nu}) = \frac{H(\tilde{\nu}) \cdot I(\tilde{\nu})}{2} \quad (4.2.2)$$

$I(\tilde{\nu})$ ist die Intensität der Strahlung bei einer bestimmten Wellenzahl und $H(\tilde{\nu})$ ist ein geräteabhängiger Faktor, in dem die Eigenschaften des Strahlteilers, der Spiegel, des Detektors und der elektronischen Filter zusammengefasst sind.

Gleichung 4.2.1 kann mathematisch als Fourierreihe mit reinen Cosinustermen und den Fourierkoeffizienten $B(\tilde{\nu})$ (=Spektrum) angesehen werden. Die Fourierkoeffizienten $B(\tilde{\nu})$ berechnen sich damit zu

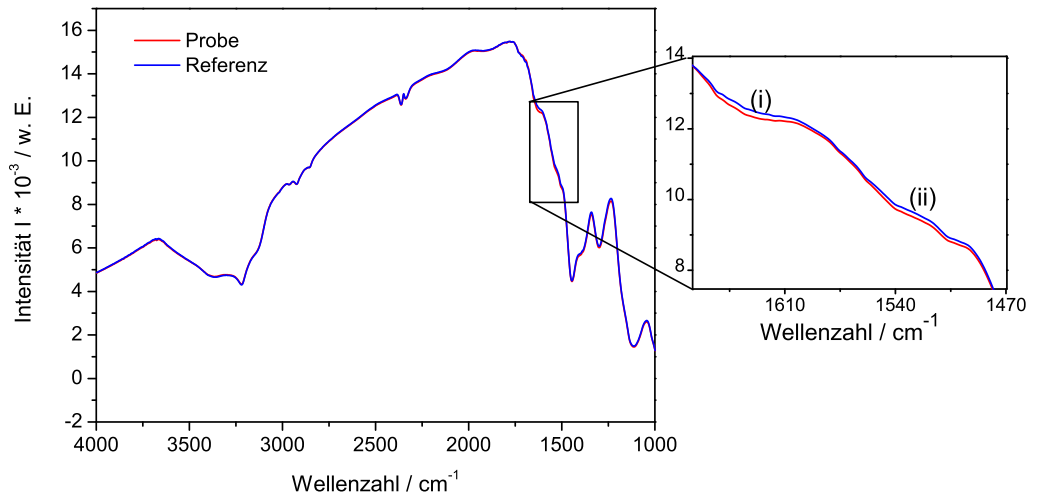
$$B(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} I^{AC}(\delta) \cos 2\pi\tilde{\nu}\delta \cdot d\delta \quad (4.2.3)$$

Gemäß Gleichung 4.2.1 und Gleichung 4.2.3 lassen sich $I^{AC}(\delta)$ und $B(\tilde{\nu})$ durch Fourier-Transformation ineinander überführen.

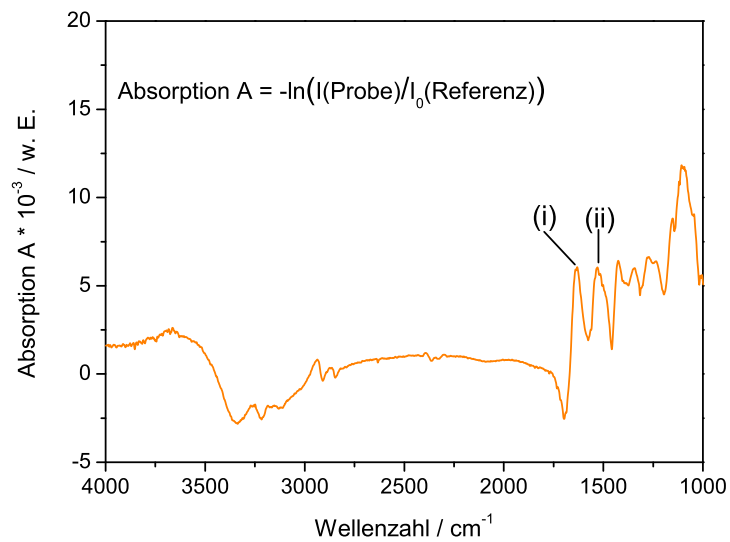
Die Absorption durch eine Probe berechnet sich schließlich über

$$A(\tilde{\nu}, t) = -\log \frac{I_S(\tilde{\nu}, t)}{I_R(\tilde{\nu})}, \quad (4.2.4)$$

wobei $I_S(\tilde{\nu}, t)$ die Intensität des Strahls nach Durchgang durch die Probe (sample) ist und $I_R(\tilde{\nu})$ die Referenz-Intensität ist, also ohne Probe. I_R kann aber z.B. auch eine Probe sein, bei der sich etwas verändert (z.B. Anbindung einer Proteinschicht), und I_S wird zu einer späteren Zeit aufgenommen. Diese Methode wird Differenz-Spektroskopie genannt und kommt in vorliegender Arbeit zum Einsatz. In Abbildung 4.2.3 sind zwei absolute Intensitätsspektren zu sehen, aus denen dann ein Absorptionsspektrum berechnet wurde (oben). Es handelt sich um ein typisches Protein-Spektrum mit Absorptionen im Amid-Bereich.



(a)



(b)

Abbildung 4.2.3: (a) Absolute Intensitätsspektren von Probe und Referenz; (b) daraus berechnete Absorption. Es handelt sich um ein typisches Protein-Spektrum mit deutlich ausgeprägten Peaks in der Amid-Region: (i) Amid-I-, (ii) Amid-II-Bande.

4.2.2 Methoden der zeitaufgelösten Infrarotspektroskopie

4.2.2.1 Rapid-Scan-Mode

Die Rapid-Scan-Technik ist die allgemein verwendete Technik für die Aufzeichnung von FTIR-Spektren. Einen Zyklus der Spiegelbewegung (Beschleunigen- konstante Vorwärtsbewegung- Abbremsen- Beschleunigen in der Rückwärtsrichtung- konstante Rückwärtsbewegung- Abbremsen) bezeichnet man als „Scan“.

Die Zeitauflösung wird durch die mechanischen und elektronischen Eigenschaften der verwendeten Messkette bestimmt. Sie liegt in der Größenordnung der Zeit, die für einen vollständigen Zyklus des beweglichen Spiegels notwendig ist. Die Rapid-Scan-Technik erlaubt zeitaufgelöste Messungen, ohne dass das Experiment reproduzierbar (reversibel) wiederholt werden muss.

Die Spiegelgeschwindigkeit ist für ein Spektrometer eine konstante Größe, die nicht weiter optimiert werden kann. Eine Möglichkeit, die Zeit für einen Scan zu verkürzen, besteht in der Wahl einer niedrigeren spektralen Auflösung. Die Standardauflösung liegt oft bei 4 cm^{-1} . Näheres zu Beschränkungen der Spiegelgeschwindigkeit ist in [86] beschrieben. Eine Verbesserung der Zeitauflösung um maximal den Faktor 4 gelingt durch Aufzeichnen von Interferogrammen auch beim Zurückfahren des Spiegels und Betrachtung jeder Interferogrammhälfte als zeitlich unterschiedliches Interferogramm. Die minimale Zeit, die ein kommerzielles FTIR-Spektrometer (z. B. das für die vorliegende Arbeit zum Einsatz kommende Spektrometer VERTEX 70 von Bruker) für einen Scan benötigt, liegt in der Größenordnung 50ms.

4.2.2.2 Step-Scan-Mode

Soll die Zeitauflösung kleiner als die Scan-Zeit sein, so muss die Datenaufnahme der einzelnen Abtastpunkte des Interferogramms durch einen vollkommen anderen Algorithmus erfolgen. Voraussetzung dafür ist, dass das Experiment reproduzierbar (reversibel) durchgeführt werden und der Beginn des Experimentes mittels eines Triggers gestartet werden kann. Bei der Step-Scan-Technik wird im Gegensatz zur Rapid-Scan-Technik ein Spiegel des Interferometers „stufenförmig“ bewegt. Bei jeder Spiegelauslenkung (Retardierung), für die bei gegebener Auflösung und spektraler Bandbreite ein Interferogrammpunkt benötigt wird, bleibt der Spiegel stehen. Nach einer entsprechenden Wartezeit (Abbremsen und Stabili-

sieren der Spiegelposition) können das Experiment gestartet und die zeitaufgelösten Datenpunkte für diese Interferogrammposition erfasst werden. Nachdem an allen Interferogrammpositionen die zeitaufgelösten Datenpunkte erfasst worden sind, werden die zeitgleichen Messpunkte zu den zeitaufgelösten Interferogrammen zusammengefasst.

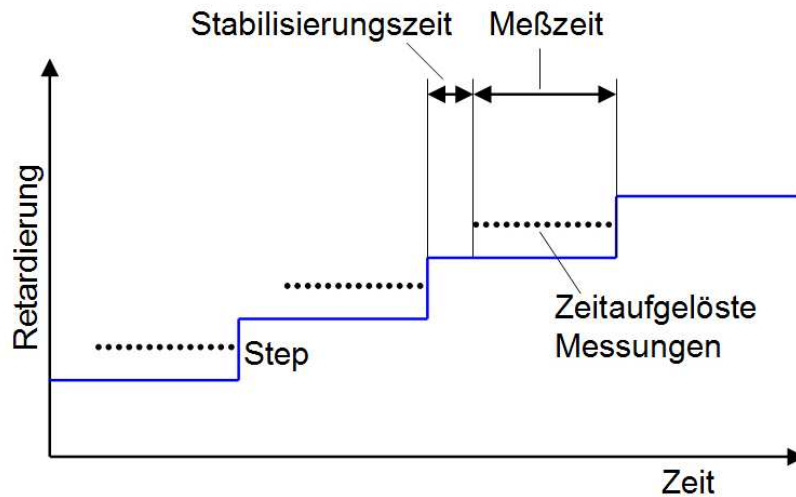


Abbildung 4.2.4: Schematische Darstellung der stufenförmigen Bewegung des beweglichen Spiegels. Nach Fortschreiten des Spiegels muss eine Stabilisierungszeit abgewartet werden. Danach wird das Experiment gestartet und die zeitaufgelösten Messpunkte für die entsprechende Interferogrammposition werden aufgezeichnet. [87]

Die Qualität dieses Messprinzips ist im Wesentlichen von der genauen Positionierung und Stabilität des beweglichen Spiegels abhängig. in Abbildung 4.2.4 ist die stufen- (step-)förmige Bewegung des beweglichen Spiegels schematisch dargestellt.

4.3 ATR-FTIR-Spektroskopie

4.3.1 Abgeschwächte Totalreflexion (ATR)

Die hier zur Anwendung kommende Methode der Infrarot-Spektroskopie ist die der internen Reflexion des Strahls in einem Reflexionselement. Der Strahl wird

4.3 ATR-FTIR-Spektroskopie

total reflektiert, aber ein evaneszentes Feld regt Schwingungen von Molekülen an, die auf der reflektierenden Ebene adsorbiert sind. Diese Methode eignet sich optimal zur Analyse von dünnen Schichten, denn im Gegensatz zu Transmissionsexperimenten werden hier Absorptionssignale der Umgebung, z.B. des Lösungsmittels, weitgehend verhindert, da die Stärke des evaneszenten Feldes exponentiell mit dem Abstand von der Oberfläche des Reflexionselementes abnimmt. Die Eindringtiefe kann meist mit einigen hundert Nanometern abgeschätzt werden. Dadurch verbessert man das SNR. Auch bei der Methode mit externer streifenförmiger Reflexion („grazing incidence“) misst man die Absorption durch umgebende Medien mit. In Abbildung 4.3.1 sind die Methoden einander gegenübergestellt.

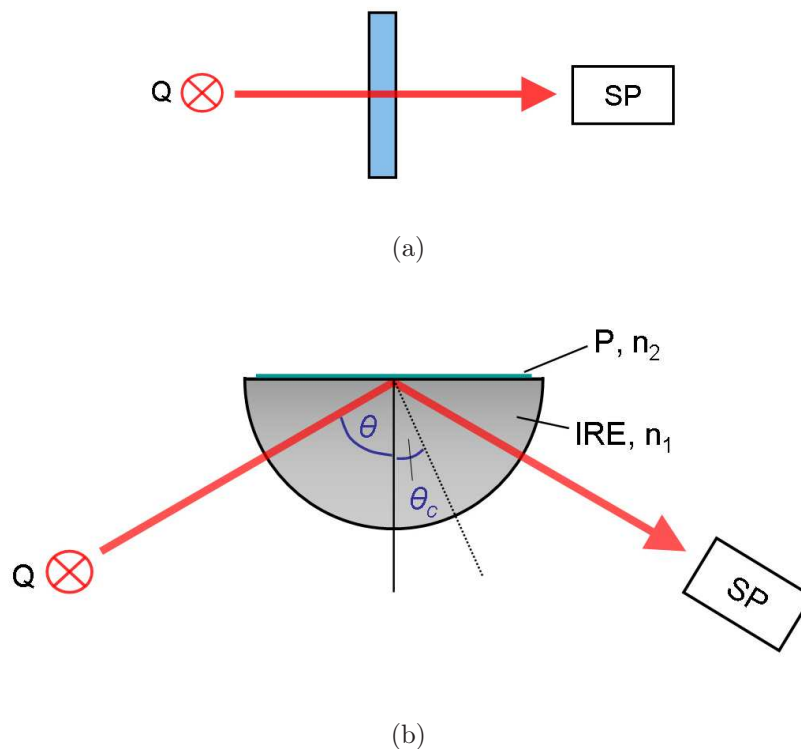


Abbildung 4.3.1: Vergleich der beiden Methoden der IR-Absorptionsmessung; (a) Transmission und (b) interne Reflexion. Q: Infrarot-Strahlungsquelle; P: Probe mit Brechungsindex n_2 ; SP: Spektrometer; IRE: Internes Reflexionselement mit Brechungsindex n_1 ; θ = Einfallswinkel; θ_c = kritischer Einfallswinkel. Die Abbildung ist einer Abbildung aus [88] nachempfunden.

Der total reflektierte Strahl dringt in geringem Ausmaß (ca. eine Wellenlänge) in das optisch dünnere Medium ein und bewirkt dort ein elektromagnetisches Feld, welches als evaneszentes Feld bezeichnet wird. Die elektrische Feldstärke $E(z)$ nimmt mit dem Abstand z von der Oberfläche des Reflexionselements exponentiell ab:

$$E(z) = E_0 \cdot e^{-z/d_p} \quad (4.3.1)$$

Dabei ist E_0 die elektrische Feldstärke bei $z=0$ und d_p ist die Eindringtiefe, welche gegeben ist durch:

$$d_p = \frac{\lambda/n_1}{2\pi\sqrt{\sin^2\theta - n_{21}^2}} \quad (4.3.2)$$

Dabei ist λ die Wellenlänge des IR-Strahl, n_1 ist der Brechungsindex von Medium 1 und n_{21} ist das Verhältnis der Brechungsindizes von Medium 2 und Medium 1. Das evaneszente Feld kann mit Substanzen, die im Bereich der Eindringtiefe liegen, wechselwirken, d.h. teilweise absorbiert und dadurch abgeschwächt werden. Daraus leitet sich der Name dieser Technik ab: ATR= attenuated total reflection, abgeschwächte Totalreflexion.

4.3.2 Absorption von IR-Strahlung in der ATR-Konfiguration

Die Absorption von Infrarot-Strahlung durch Molekülschwingungen wurde bereits diskutiert (s. Abschnitt 4.1, Gleichung 4.1.13). Die Gleichung gilt auch hier, wobei die Proportionalität zum elektrischen Feld mit in die Gleichung geschrieben wird: im Fall der ATR-Spektroskopie ist die Intensität I einer Absorption dem Skalarprodukt aus der relativen elektrischen Feldstärke \vec{E}^r und der Änderung des Übergangsdipolmoments $\left| \frac{\partial \vec{\mu}}{\partial Q} \right|$ einer Molekülschwingung proportional:

$$A \propto \vec{E}^r \bullet \left| \frac{\partial \vec{\mu}}{\partial Q} \right| = |\vec{E}^r|^2 \cdot \left| \frac{\partial \vec{\mu}}{\partial Q} \right|^2 \cdot \cos^2(\vec{E}^r, \vec{\mu}) \quad (4.3.3)$$

Wird polarisierte Strahlung verwendet, so ist die Absorption auch von der verwendeten Polarisation abhängig. Bei p-polarisierter Strahlung können nur die x- und die z-Komponente des elektrischen Feldvektors mit dem Übergangsdipolmoment wechselwirken und somit zur Absorption beitragen. Entsprechendes gilt bei s-Polarisation für die y-Komponente von \vec{E} . Die Komponenten sind in Abbildung

4.3 ATR-FTIR-Spektroskopie

4.3.2 eingezeichnet.

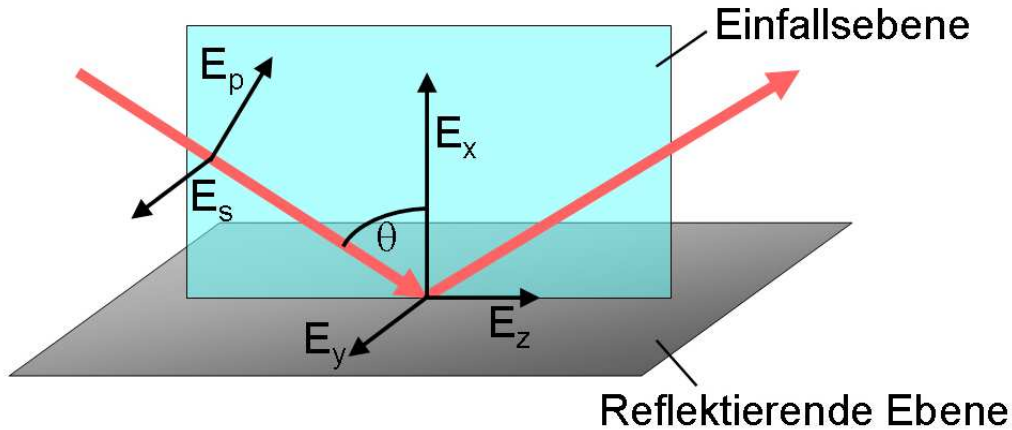


Abbildung 4.3.2: Definiertes Koordinatensystem für die Komponenten der elektrischen Feldstärke. E_s ist die Komponente des einfallenden Feldes senkrecht zur Einfallsebene (s-polarisierter Anteil), E_p ist der Anteil parallel zur Einfallsebene (p-polarisierter Anteil).

Trifft Licht auf eine Grenzfläche zwischen zwei transparenten Medien mit den Brechungsindizes n_1 und n_2 , so wird ein Teil des Lichtes reflektiert und ein Teil transmittiert. Aus den beiden Brechungsindizes wird oft ein gemeinsamer Index $n_{21}=n_2/n_1$ bzw. $n_{12}=n_1/n_2$ gebildet. Die reflektierten Amplituden für den parallel und für den senkrecht zur Einfallsebene polarisierten Anteil sind durch die Fresnel-Gleichungen gegeben:

$$r_s = \frac{\cos \theta - i\sqrt{(\sin^2 \theta - n_{21}^2)}}{\cos \theta + i\sqrt{(\sin^2 \theta - n_{21}^2)}} \quad (4.3.4)$$

und

$$r_p = \frac{n_{21}^2 \cos \theta - i\sqrt{\sin^2 \theta - n_{21}^2}}{n_{21}^2 \cos \theta + i\sqrt{\sin^2 \theta - n_{21}^2}} \quad (4.3.5)$$

Im Folgenden seien die Komponenten der elektrischen Feldstärke in einer auf der reflektierenden Ebene adsorbierten Schicht gegeben. Sie werden in [89] aus

den Fresnelschen Gleichungen hergeleitet, wobei in der gemachten Näherung die Schicht deutlich kleiner sein muss als die Eindringtiefe d_p der evaneszenten Welle. Dies ist der Fall, denn die Eindringtiefe beträgt (s.o.) mehrere hundert Nanometer, während die Schicht aus Proteinen in einer künstlichen Membran (s. Abschnitt 3.3) max. 10 nm dick ist. Diese Näherung wird als Dünnschicht-Approximation (thin layer approximation) bezeichnet. In der Herleitung wird ein Dreischichten-System betrachtet. Schicht eins ist das ATR-Messelement, also z.B. ein Silizium-Kristall. Schicht zwei ist die zu untersuchende Schicht z.B. adsorbierter Proteine und Schicht drei ist die Bulk-Phase (wässrige Phase). Es gilt:

$$E_x^r = \frac{E_x}{E_p} = \frac{2 \cos \theta \sin \theta n_{32}^2}{\sqrt{1 - n_{31}^2} \sqrt{(1 + n_{31}^2) \sin^2 \theta - n_{31}^2}} \quad (4.3.6)$$

$$E_z^r = \frac{E_z}{E_p} = \frac{2 \cos \theta \cdot \sqrt{\sin^2 \theta - n_{31}^2}}{\sqrt{1 - n_{31}^2} \sqrt{(1 + n_{31}^2) \sin^2 \theta - n_{31}^2}} \quad (4.3.7)$$

$$E_y^2 = \frac{E_y}{E_s} = \frac{2 \cos \theta}{\sqrt{1 - n_{31}^2}} \quad (4.3.8)$$

Dabei sind E_x^r , E_y^r und E_z^r die relativen elektrischen Feldkomponenten im Medium zwei. E_x , E_y und E_z sind die absoluten elektrischen Feldkomponenten im Medium zwei, E_p und E_s sind die parallel bzw. senkrecht polarisierte Feldkomponenten des einfallenden Strahls in Medium 1 (s. Abbildung 4.3.2).

4.3.3 Oberflächenverstärkte ATR-FTIR-Spektroskopie

In der oberflächenverstärkten ATR-FTIR-Spektroskopie wird die Oberfläche des ATR-Kristalls mit einer dünnen, rauen Metallschicht überzogen, bevor die zu untersuchende Schicht adsorbiert wird. Es werden lokalisierte Plasmonen angeregt, die durch die Feldverstärkung zu einer Verstärkung der Absorption führen (dies folgt unmittelbar aus Gleichung 4.3.3). In der Arbeit von Hartstein et al. [90] wird zum ersten Mal eine systematische Untersuchung zur oberflächenverstärkten Infrarotspektroskopie präsentiert, wobei Metallschichten sowohl auf die zu untersuchende Schicht als auch unter diese Schicht präpariert wurden. Der Me-

4.3 ATR-FTIR-Spektroskopie

chanismus der Oberflächenverstärkung wird auf eine elektrische Feldverstärkung zurückgeführt, die durch kollektive elektronische Resonanzen in den Nanopartikeln verursacht wird.

In [91] wird eine Modell-Simulation dazu präsentiert. Dabei wird ein System aus Silberinseln mit einem darauf durch Langmuir-Blodgett-(LB-)Transfer adsorbierten dielektrischen Monolayer modelliert. Mit einer quantenmechanischen Theorie wird eine effektive dielektrische Konstante der gemischten Schicht aus Silber-Inseln und Monolayer berechnet, wobei die Silber-Inseln als Ellipsoide approximiert werden.

Die gemischte Schicht hat einen komplexen Brechungsindex n_2 , welcher zwischen den zwei Schichten Vakuum (n_1) und dem Substrat (n_3) liegt (s. Abbildung 4.3.3).

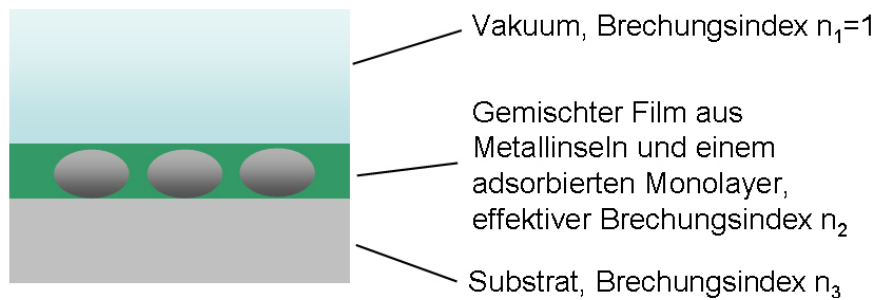


Abbildung 4.3.3: Modell zur Simulation des Verstärkungseffekts durch Silber-Nanopartikel. Die Silberinseln werden als oblate Ellipsoide modelliert, ein effektiver Brechungsindex der gemischten Schicht aus Metallinseln und Dielektrikum wird für die Rechnung benutzt.

Die effektive dielektrische Konstante der gemischten Schicht aus Metallinseln und Dielektrikum kann mit zwei verschiedenen Modellen berechnet werden [92]. Eines davon ist das Maxwell-Garnett-(MG-)Modell, wonach gilt:

$$\epsilon_{MG} = \epsilon_h \frac{3 + 2F\alpha}{3 - F\alpha} \quad (4.3.9)$$

In dieser Gleichung ist ϵ_h die dielektrische Konstante des umgebenden dielektrischen Mediums (in Abbildung 4.3.3 grün), F ist der Dichtefaktor der Metallinseln, welcher durch $\frac{d_{Masse}}{d_{optisch}}$ definiert ist. α ist die Polarisierbarkeit der Metallteilchen.

α lässt sich gemäß Gleichung 4.3.10 berechnen [93] (Osawa et al.).

$$\alpha_{\parallel,\perp} = \left(\frac{((\epsilon_d - 1) \cdot [\epsilon_m L_1 + \epsilon_d(1 - L_1)] + Q(\epsilon_m - \epsilon_d) \cdot [\epsilon_d(1 - L_2) + L_2])}{[\epsilon_d L_2 + \epsilon_d(1 - L_1)] + Q(\epsilon_m - \epsilon_d)(\epsilon_d - 1)L_2(1 - L_2)} \right)_{\parallel,\perp} \quad (4.3.10)$$

Q steht in dieser Gleichung für das Volumenverhältnis aus V_1/V_2 der Metallteilchen mit und ohne die LB-Schicht. Die Depolarisationsverhältnisse L_1 und L_2 repräsentieren die Längenverhältnisse der Metallteilchen. ϵ_d und ϵ_m sind die Dielektrizitätskonstanten der dielektrischen Schicht und der Metallteilchen. Die dielektrischen Konstanten der Silberteilchen sind durch folgende Gleichung gegeben:

$$\epsilon_m = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + \frac{i}{\tau})} \quad (4.3.11)$$

Dabei ist ω_p die Plasmafrequenz ($1,38 \cdot 10^{16}/\text{s}$) und τ ist die Relaxationszeit von Silber ($3,1 \cdot 10^{-14}$ s).

Mit diesen Gleichungen wird eine bestimmte starke Absorptionsbande simuliert, wobei wieder die Methode in [93] benutzt wird. Die simulierten Absorptionen bestätigen die ebenfalls präsentierten Experimente teilweise, teilweise weichen sie aber auch erheblich davon ab. Der Verstärkungsfaktor wird zu etwa 30 bestimmt. In den verschiedenen veröffentlichten Arbeiten [90] [91] [94] werden Verstärkungsfaktoren zwischen 20 und 40 berichtet. Die in vorliegender Arbeit benutzte Methode basiert auf einer chemisch deponierten rauen Goldoberfläche [94], die eine Struktur aus Nanopartikeln aufweist (s. Abbildung 4.3.4).

Es muss betont werden, dass es zum Oberflächenverstärkungseffekt in der Infrarotspektroskopie bis heute keine einheitliche Theorie gibt. In vorliegender Arbeit wird der Verstärkungsfaktor ebenfalls gemessen (s. Abschnitt 9.1).

Abschließend muss hervorgehoben werden, dass die Metallschicht zwischen Kristall und dielektrischer Schicht die Messung durch s-polarisierte Strahlung verhindert, da das elektrische Feld in der Ebene der Metallschicht kurzgeschlossen

4.4 Phasensensitive Detektion (PSD) bei Modulations-angeregter FTIR-Spektroskopie

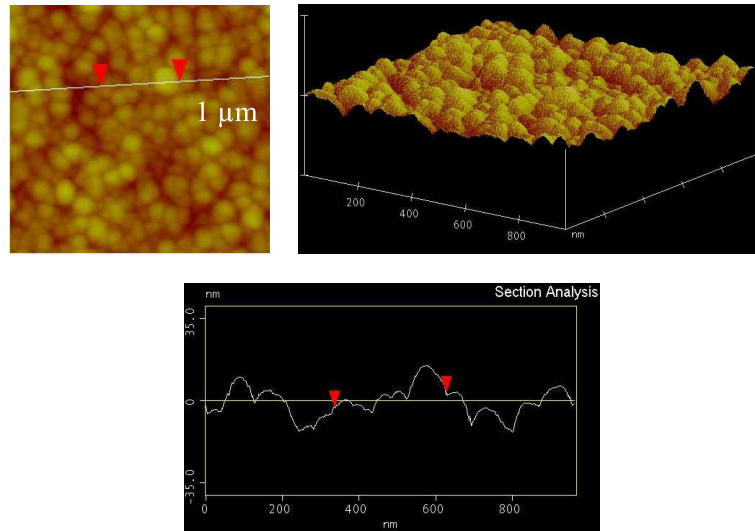


Abbildung 4.3.4: AFM-Aufnahme der rauen Goldschicht. Die Oberfläche besteht aus Gold-Nanopartikeln, die einen Durchmesser von 10 bis 50 nm haben. Die Schicht ist 20 nm dick.

wird. E_y und E_z verschwinden daher (s. Abbildung 4.3.2) und es können nur Schwingungen senkrecht zur Reflexionsebene detektiert werden.

4.4 Phasensensitive Detektion bei Modulations-angeregter FTIR-Spektroskopie

4.4.1 Grundlagen der phasensensitiven Detektion

Die in dieser Arbeit zur Anwendung kommende Technik der phasensensitiven Detektion (PSD) folgt der Methodik, die in [95] beschrieben ist. Die Detektion kleiner Änderungen im Absorptionsspektrum wird in vielen Experimenten durch ein großes Hintergrundsignal erschwert. Eine gute Kompensation des Hintergrundsignals wird durch die Technik der Differenzspektroskopie erreicht und generell bei Experimenten an dünnen Schichten angewendet [96]. Um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) weiter zu verbessern, ist die Anwendung zeitabhängiger Stimulation zweckmäßig, sofern das zu beobachtende System auf die Anregung reagiert. Möglich ist die Änderung verschiedener externer Parameter wie Druck, Tempe-

ratur, Konzentration einer Spezies, elektrisches Potential etc.

In der Praxis kommen zwei verschiedene Methoden für die externe Stimulation zum Einsatz, welche zusätzliche Informationen über die Reaktionskinetik liefern: zum einen ist dies die Relaxationstechnik, bei der ein Parameter sprunghaft geändert wird, und zum anderen die Modulationstechnik, bei der ein Parameter moduliert wird. Die Modulationstechnik kann immer dann angewendet werden, wenn das System reversibel oder quasireversibel auf eine externe Anregung antwortet. Wenn die detektierte Absorption einen modulierten Anteil enthält, kann dieser eindeutig dem Teil des Systems zugeordnet werden, der durch die Modulation beeinflusst wird. Die Anregungsfrequenz muss so gewählt werden, dass die kinetischen Parameter der zu untersuchenden Prozesse im Bereich der Anregungsfrequenz liegen. Bezogen auf die CcO heißt das, dass die für die Übertragung von Elektronen von der Elektrode auf die Redoxzentren benötigte Zeit in etwa der halben Anregungsperiode entsprechen sollte. Die Systemantwort besteht dann hauptsächlich aus modulierten Absorptionsbanden der Anregungsfrequenz ω (Fundamentalfrequenz) bzw. den harmonischen Oberfrequenzen. Die Komponenten des Systems, die nicht auf die Modulation reagieren, tragen nicht zu der modulierten spektralen Antwort (DC-Anteil) bei, sondern erzeugen einen unmodulierten AC-Anteil. Die Eliminierung des Hintergrundsignals erfolgt dann durch die Separation des AC- vom DC-Anteil. Dies geschieht sehr effektiv durch die Anwendung von phasensensitiver Detektion (PSD) und wird auch als Quadratur-Demodulation bezeichnet [97]. Absorptionskomponenten im Spektrum, die z.B. vom apparativen Setup stammen, werden durch die modulierte Anregung im Allgemeinen nicht beeinflusst und sind im DC-Anteil nicht enthalten. PSD trennt den DC- vom AC-Anteil und ermöglicht eine selektive Detektion nur der Signale, die genau mit einer Frequenz moduliert sind, die der Anregungsfrequenz ω bzw. einer harmonischen Oberschwingung entsprechen. PSD ist eine Technik, die eine Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses um mehrere Größenordnungen ermöglicht. Dies wird durch die Eliminierung des größten Teils des Hintergrundsignals erreicht.

Experimente mit einer modulierten Anregung ermöglichen zudem eine kinetische Analyse der betrachteten dynamischen Prozesse, welche durch die Stimulation initiiert werden. Bewegt sich die Anregungsfrequenz im Bereich der Relaxationszeit des Systems, so sind Amplitude und Phasenverzögerung der Systemantwort

4.4 Phasensensitive Detektion (PSD) bei Modulations-angeregter FTIR-Spektroskopie

abhängig von der Anregungsfrequenz ω . Eine zunehmende Anregungsfrequenz geht mit einer abnehmenden Amplitude und zunehmenden Phasenverschiebungen der Grundfrequenz und der harmonischen Obertöne der Systemantwort einher. Zeigen sich bei einer sinusförmigen Anregung harmonische Obertöne in der Systemantwort, so lässt dies auf eine nichtlineare Signal-Weiterleitung schließen. Bei der Kinetik chemischer Reaktionen z.B. zeigt eine nichtlineare Antwort an, dass die Reaktionskinetik nicht erster Ordnung ist [98] [99].

Phasenaufgelöste modulierte Spektren eignen sich darüber hinaus außerordentlich gut für die Separation von stark überlappenden Banden, welche sich ohne diese Technik nicht mehr auflösen ließen. Eine Voraussetzung hierfür ist, dass die überlappenden Banden von Komponenten des Systems stammen, die unterschiedliche kinetische Konstanten haben. Dies resultiert in unterschiedlichen Phasenverschiebungen gegenüber der Anregungsfrequenz. So werden die jeweiligen Absorptionen bei phasenaufgelösten Spektren mit verschiedenem eingesetzten Phasenwinkel ϕ_{PSD} maximal. Diese Eigenschaft der PSD kann sehr effektiv für die Separation einer schwachen Bande von einer überlagerten starken Bande eingesetzt werden. Hierzu muss der kontrollierbare Phasenwinkel ϕ_{PSD} so gewählt werden, dass das starke Signal verschwindet, wodurch eine experimentelle Bestimmung der Parameter der zu untersuchenden Bande ermöglicht wird (Position, Halbwertsbreite, Absorptionsamplitude).

In konventionellen PSD-Experimenten wurde die PSD während der Datenaufnahme des Interferogramms durchgeführt, was zu verschiedenen Problemen führte. U.a. verlängert sich hierdurch die Messzeit und ein komplexer Messaufbau mit zusätzlichen Lock-In-Verstärkern ist erforderlich [95]. Für den hier beschriebenen PSD-Algorithmus ist die experimentelle Voraussetzung lediglich die Aufnahme zeitaufgelöster Spektren eines periodisch stimulierten Systems, was relativ leicht durch verschiedene Techniken der Datenaufnahme realisiert werden kann. Die PSD wird nach der Datenaufnahme in Form einer Vektor-PSD [100] durchgeführt. Ein großer Bereich von Modulationsfrequenzen kann eingesetzt werden, welcher nur durch die Stabilität der Probe (bei langer Messzeit durch niedrige Frequenzen) und durch die verarbeitende Elektronik (bei hohen Frequenzen) eingeschränkt wird [101] [102]. An dieser Stelle sei betont, dass die hier beschriebene Methode für Modulations-angeregte FTIR-Spektroskopie allgemein für jede zeitaufgelöste spektroskopische Messung anwendbar ist.

4.4.2 Modulierte Anregung

Die periodische Stimulation und die daraus resultierenden Änderungen in der Absorption sind in Abbildung 4.4.1 veranschaulicht.

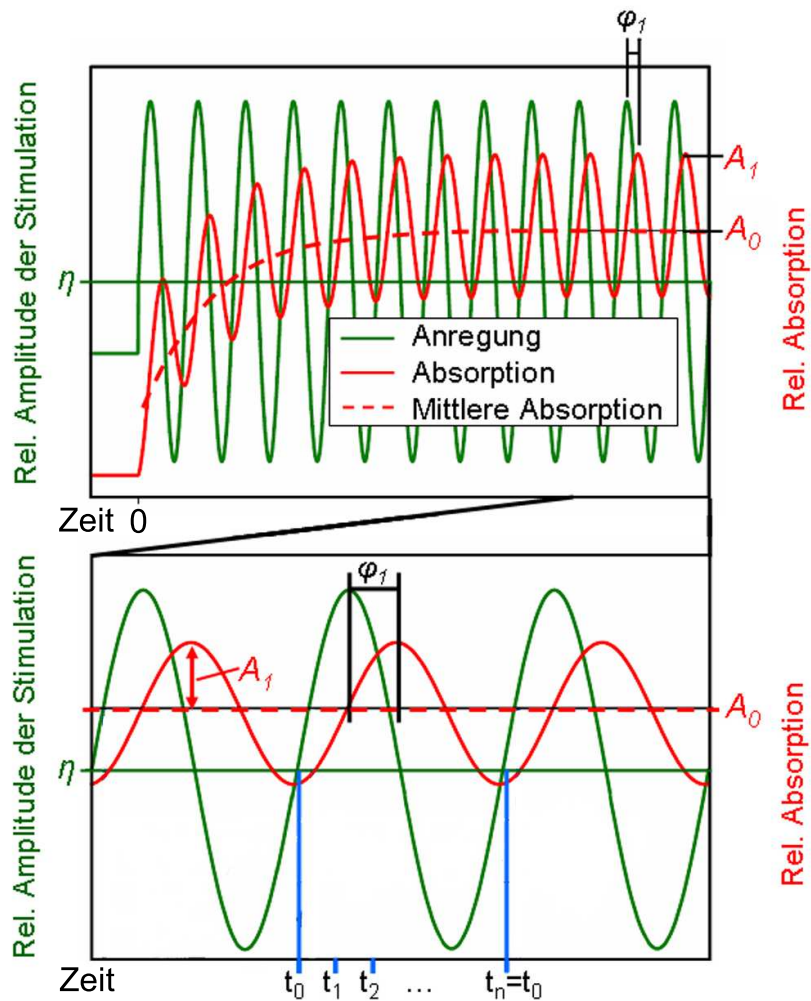


Abbildung 4.4.1: Oben: Periodische Stimulation (grün) und daraus resultierende Änderungen in der Konzentration einer absorbierenden Spezies (rot); unten: Ausschnitt. Details sind im Text erläutert.

Das obere Bild zeigt eine periodische Stimulation und daraus resultierende Änderungen in der Konzentration einer absorbierenden Spezies. Die sinusförmige Anregung startet bei $t=0$ mit einem zusätzlichen Sprung auf einen Mittelwert η . Nach einer bestimmten Zeitdauer- im Beispiel etwa 5 Perioden- ist der stationäre

4.4 Phasensensitive Detektion (PSD) bei Modulations-angeregter FTIR-Spektroskopie

Zustand erreicht. Dann variiert die Absorption periodisch um den Mittelwert A_0 . Ein Ausschnitt der Abbildung ist im unteren Bild dargestellt. Im stationären Zustand gibt es eine Phasendifferenz φ_1 zwischen der Stimulation und der Absorption der angeregten Spezies, welche charakteristisch für die Kinetik des stimulierten Systems ist. A_1 ist die Amplitude der modulierten Absorption. Das Beispiel zeigt eine sinusförmige Anregung, so dass keine harmonischen Obertöne in der Antwort des Systems zu beobachten sind. In einem Modulations-Experiment wird die Datenaufnahme im stationären Zustand durchgeführt, es muss gewartet werden, bis die „Einschwingperioden“ vorbei sind.

Zu den Zeiten t_i ($i=0,1,\dots,n-1$) werden n zeitaufgelöste Spektren aufgenommen, welche zu Beginn jeder Stimulationsperiode getriggert werden. Die Anzahl der n zeitaufgelösten Spektren muss genau in die Zeitdauer einer Periode passen.

Eine modulierte Anregung einer Probe durch einen externen Parameter kann modulierte Änderungen in der Konzentration $c_i(t)$ einer Spezies X_i zur Folge haben. Der Ausdruck Spezies kann hierbei ein Molekül, eine funktionelle Gruppe, oder allgemeiner, der *spezifische Zustand eines Moleküls* sein (Orientierung, Sekundärstruktur etc.). Die periodische, zeitabhängige Absorption durch mehrere überlappende Banden verschiedener Spezies X_i ist allgemein durch das Lambert-Beersche Gesetz gegeben:

$$A(\tilde{\nu}, t) = \sum_i A_i(\tilde{\nu}, t) = \sum_i \epsilon_i(\tilde{\nu}, t) \cdot c_i(t) \cdot d(t) = -\log \frac{I_S(\tilde{\nu}, t)}{I_R(\tilde{\nu})} \quad (4.4.1)$$

Dabei sind $I_S(\tilde{\nu}, t)$ die zeitabhängigen Einzelkanalintensitäten der Probe P (sample) und $I_R(\tilde{\nu})$ ist die Einzelkanalintensität der Referenz R. $\epsilon_i(\tilde{\nu}, t)$ ist der Absorptionskoeffizient der jeweiligen Spezies i und d ist die Dicke der Probe.

Die Beschreibung der Funktion $A(\tilde{\nu}, t)$ im Frequenz-Raum ist Gegenstand der folgenden Betrachtungen.

4.4.3 Fourieranalyse

Nach dem Fouriertheorem kann jede periodische Funktion der Periode T in eine Fourierreihe der Form

$$f(t) = a_0 + \sum_{k=1}^{\infty} [a_k \cos(k\omega t) + b_k \sin(k\omega t)] \quad (4.4.2)$$

zerlegt werden. $k=0$ entspricht dem DC-Anteil, $k=1$ der Fundamentalfrequenz (Anregungsfrequenz) und $k>1$ den Oberschwingungen. Somit ist a_0 der DC-Anteil. a_k ist der Fourierkoeffizient der Kosinus-Komponente der Frequenz $k\omega$ und b_k ist der Fourierkoeffizient der Sinus-Komponente der Frequenz $k\omega$. Die Fourierkoeffizienten a_0 , a_k und b_k der periodischen Funktion $f(t)$ sind durch folgende Ausdrücke gegeben:

$$\begin{aligned} a_0 &= \frac{1}{T} \cdot \int_0^T f(t) dt, \\ a_k &= \frac{2}{T} \cdot \int_0^T f(t) \cos(k\omega t) dt \quad k = 1, 2, \dots, \\ b_k &= \frac{2}{T} \cdot \int_0^T f(t) \sin(k\omega t) dt \quad k = 1, 2, \dots \end{aligned} \quad (4.4.3)$$

a_k und b_k repräsentieren die orthogonalen Komponenten eines Vektors, welcher auch in Polarkoordinaten mit einer Amplitude c_k und einem Phasenwinkel φ_k ausgedrückt werden kann. Es gilt dann

$$\begin{aligned} a_k &= c_k \sin \varphi_k, \\ b_k &= c_k \cos \varphi_k \end{aligned} \quad (4.4.4)$$

Unter Benutzung der trigonometrischen Relation

$$\sin \alpha \cos \beta + \cos \alpha \sin \beta = \sin(\alpha + \beta)$$

kann die Fourier-Reihe aus Gleichung 4.4.2 als Sinus-Reihe mit zusätzlichem Phasenwinkel φ_k ausgedrückt werden:

4.4 Phasensensitive Detektion (PSD) bei Modulations-angeregter FTIR-Spektroskopie

$$\begin{aligned}
 f(t) &= a_0 + \sum_{k=1}^{\infty} [c_k \sin \varphi_k \cos(k\omega t) + c_k \cos \varphi_k \sin(k\omega t)] \\
 &= a_0 + \sum_{k=1}^{\infty} c_k \sin(k\omega t + \varphi_k)
 \end{aligned} \tag{4.4.5}$$

Die Amplituden c_k und die Phasenverschiebungen φ_k sind gegeben durch

$$a_k^2 + b_k^2 = c_k^2 (\sin^2 \varphi_k + \cos^2 \varphi_k) = c_k^2 \tag{4.4.6}$$

mit

$$c_k = \sqrt{a_k^2 + b_k^2} \tag{4.4.7}$$

$$\sin \varphi_k = \frac{a_k}{c_k}, \quad \cos \varphi_k = \frac{b_k}{c_k} \tag{4.4.8}$$

In einem spektroskopischen Experiment besteht die Gesamtabsorption $A(\tilde{\nu}, t)$ (s. Gleichung 4.4.1) aus einem stationären (DC-) Anteil $A_0(\tilde{\nu})$ und einem modulierten Anteil $A_m(\tilde{\nu}, t)$. Besteht das System aus N absorbierenden Spezies, so erhält man für die Gesamtabsorption mit Hilfe der Fourierreihe (Gleichung 4.4.2) folgenden Ausdruck:

$$\begin{aligned}
 A(\tilde{\nu}, t) &= \sum_{i=1}^N A_i(\tilde{\nu}, t) = A_{i,0}(\tilde{\nu}) \\
 &= + \sum_{i=1}^N \sum_{k=1}^{\infty} [A_{i,k}^{90^\circ}(\tilde{\nu}) \cos(k\omega t) + A_{i,k}^{0^\circ}(\tilde{\nu}) \sin(k\omega t)]
 \end{aligned} \tag{4.4.9}$$

Im Folgenden wird der Einfachheit halber nur eine Spezies betrachtet, so dass der Index i weggelassen werden kann.

Nach Gleichung 4.4.3 steht $A_0(\tilde{\nu})$ für die mittlere Absorption in einer Anregungsperiode (DC-Anteil):

$$A_0(\tilde{\nu}) = \frac{1}{T} \cdot \int_0^T A(\tilde{\nu}, t) dt \tag{4.4.10}$$

$A_k^{0^\circ}(\tilde{\nu})$ ist der Sinus-Fourierkoeffizient (0° , in Phase) und $A_k^{90^\circ}(\tilde{\nu})$ der Kosinus-Fourierkoeffizient (90° , außer Phase) der Frequenz $k\omega$. Unter Benutzung von Gleichung 4.4.3 und Gleichung 4.4.4 können $A_k^{0^\circ}(\tilde{\nu})$ und $A_k^{90^\circ}(\tilde{\nu})$ folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$A_k^{0^\circ}(\tilde{\nu}) = A_k(\tilde{\nu}) \cdot \cos[\varphi_k(\tilde{\nu})] = \frac{2}{T} \cdot \int_0^T A(\tilde{\nu}, t) \sin(k\omega t) dt$$

$$A_k^{90^\circ}(\tilde{\nu}) = A_k(\tilde{\nu}) \cdot \sin[\varphi_k(\tilde{\nu})] = \frac{2}{T} \cdot \int_0^T A(\tilde{\nu}, t) \cos(k\omega t) dt$$

(4.4.11)

$$k = 1, 2, \dots$$

Nach Gleichung 4.4.5 kann $A(\tilde{\nu}, t)$ auch durch eine Sinusreihe mit den Amplituden $A_k(\tilde{\nu})$ und den Phasenverschiebungen $\varphi_k(\tilde{\nu})$ ausgedrückt werden:

$$A(\tilde{\nu}, t) = A_0(\tilde{\nu}) + \sum_{k=1}^{\infty} A_k(\tilde{\nu}) \sin[k\omega t + \varphi_k(\tilde{\nu})]$$

(4.4.12)

4.4.4 Phasensensitive Detektion

Die Methode der phasensensitiven Detektion erlaubt in einem spektroskopischen Modulationsexperiment die Berechnung absoluter gemittelter Absorptionsamplituden $A_k(\tilde{\nu})$ und gemittelter Phasendifferenzen $\varphi_k(\tilde{\nu})$. In diesem Zusammenhang stellt sie eine alternative Methode zur Fourier-Analyse einer periodischen Funktion dar. Der Ausdruck „gemittelt“ soll an dieser Stelle aussagen, dass die Gesamtabsorption $A_k(\tilde{\nu})$ für eine bestimmte Frequenz $k\omega$ aus den Absorbanzen $A_{ik}(\tilde{\nu})$ aller Spezies X_i , die an der Wellenzahl $\tilde{\nu}$ absorbieren, zusammengesetzt ist. Darüber hinaus hat jede dieser Komponenten $A_{ik}(\tilde{\nu})$ ihre eigene Phasenverschiebung $\varphi_{ik}(\tilde{\nu})$.

Das analytische Vorgehen bei der PSD besteht in einer Multiplikation von $A(\tilde{\nu}, t)$ mit einer periodischen Funktion, z.B. $\sin(k\omega t + \phi_k^{PSD})$, gefolgt von einer normierten Integration über eine Periode T . So wird als neuer Parameter der kontrollierbare Phasenwinkel ϕ_{PSD} eingeführt (s. Gleichung 4.4.13):

4.4 Phasensensitive Detektion (PSD) bei Modulations-angeregter FTIR-Spektroskopie

$$A_k^{\phi_k^{PSD}}(\tilde{\nu}) = \frac{2}{T} \cdot \int_0^T A(\tilde{\nu}, t) \sin(k\omega t + \phi_k^{PSD}) dt \quad (4.4.13)$$

$$k = 1, 2, \dots$$

$A_k^{\phi_k^{PSD}}(\tilde{\nu})$ wird als phasenaufgelöstes Modulationsspektrum bzw. phasenaufgelöstes Absorptionsspektrum zu der Frequenz $k\omega$ (der Fall $k=1$ entspricht der Fundamentalfrequenz, d.h. der Anregungsfrequenz) und zu dem eingestellten PSD-Phasenwinkel ϕ_k^{PSD} bezeichnet.

In den Spezialfällen $\phi_k^{PSD}=0^\circ$ und $\phi_k^{PSD}=90^\circ$ entspricht $A_k^{\phi_k^{PSD}}(\tilde{\nu})$ der In-Phase- bzw. Ausser-Phase-Komponente in Gleichung 4.4.11.

$A_k^{\phi_k^{PSD}}(\tilde{\nu})$ kann als Linearkombination aus $A_k^{0^\circ}(\tilde{\nu})$ und $A_k^{90^\circ}(\tilde{\nu})$ ausgedrückt werden, wenn man Gleichung 4.4.13 mit Hilfe der trigonometrischen Relation

$$\sin(\alpha + \beta) = \sin \alpha \cos \beta + \cos \alpha \sin \beta$$

folgendermaßen umformt:

$$\begin{aligned} A_k^{\phi_k^{PSD}}(\tilde{\nu}) &= \frac{2}{T} \cdot \int_0^T A(\tilde{\nu}, t) \sin(k\omega t + \phi_k^{PSD}) dt \\ &= \frac{2}{T} \cdot \int_0^T A(\tilde{\nu}, t) [\sin(k\omega t) \cos(\phi_k^{PSD}) + \cos(k\omega t) \sin(\phi_k^{PSD})] dt \\ &= \frac{2}{T} \cdot \int_0^T A(\tilde{\nu}, t) \sin(k\omega t) dt \cdot \cos(\phi_k^{PSD}) \\ &\quad + \frac{2}{T} \cdot \int_0^T A(\tilde{\nu}, t) \cos(k\omega t) dt \cdot \sin(\phi_k^{PSD}) \\ &= A_k^{0^\circ}(\tilde{\nu}) \cos(\phi_k^{PSD}) + A_k^{90^\circ}(\tilde{\nu}) \sin(\phi_k^{PSD}) \end{aligned} \quad (4.4.14)$$

Einsetzen von 4.4.11 in 4.4.14 und Benutzung der trigonometrischen Relation

$$\cos \alpha \cos \beta + \sin \alpha \sin \beta = \cos(\alpha - \beta)$$

liefert:

$$\begin{aligned} A_k^{\phi_k^{PSD}}(\tilde{\nu}) &= A_k(\tilde{\nu}) \cos(\varphi_k) \cos(\phi_k^{PSD}) + A_k(\tilde{\nu}) \sin(\varphi_k) \sin(\phi_k^{PSD}) \\ &= A_k(\tilde{\nu}) \cos(\varphi_k - \phi_k^{PSD}) \end{aligned} \quad (4.4.15)$$

Wie bereits erwähnt, kann der Parameter ϕ_k^{PSD} vom Benutzer gewählt werden. Wenn ϕ_k^{PSD} gleich der Phasenverschiebung des betrachteten Signals bei einer bestimmten Frequenz ist, d.h. $\varphi_k(\tilde{\nu}) = \phi_k^{PSD}$, so liefert die Kosinus-Funktion in Gleichung 4.4.15 den Betrag eins, die Amplitude $A_k^{\phi_k^{PSD}}(\tilde{\nu})$ wird maximal und ist dann gleich der unbekanntenen Amplitude $A_k(\tilde{\nu})$. Eine Maximierung von $A_k^{\phi_k^{PSD}}(\tilde{\nu})$ für eine bestimmte Wellenzahl durch Variation von ϕ_k^{PSD} liefert demnach sowohl die Modulationsamplitude $A_k(\tilde{\nu})$ als auch die Phasenverzögerung $\varphi_k(\tilde{\nu})$ für die Frequenz $\tilde{\nu}$.

Für $\phi_k^{PSD} = \varphi_k(\tilde{\nu}) \pm 90^\circ$ hingegen liefert die Kosinus-Funktion den Beitrag null und somit gilt auch:

$$A_k^{\varphi_k(\tilde{\nu}) \pm 90^\circ}(\tilde{\nu}) = 0 \quad (4.4.16)$$

Das Ziel der phasensensitiven Detektion in der Modulationsspektroskopie ist demnach die Ermittlung der phasenaufgelösten Absorptionsspektren $A_k^{\phi_k^{PSD}}(\tilde{\nu})$ aus der zeitabhängigen Gesamtabsorption $A(\tilde{\nu}, t)$ mit Hilfe des Algorithmus, welcher durch Gleichung 4.4.13 beschrieben wird.

4.4.5 PSD zeitaufgelöster Spektren

Sowohl die PSD der Intensität $I(\tilde{\nu}, t)$, die üblicherweise in Modulationsexperimenten mit dispersiven Instrumenten zum Einsatz kommt, als auch die PSD des Interferogramms $I_S(\delta, t)$ (S steht für sample, Probe, δ steht für die Wegdifferenz im Michelson-Interferometer) in FT-Geräten werden mit skalaren Größen durchgeführt. Die vom Detektor gemessene Intensität wird in Abhängigkeit von der Wellenzahl und der Wegdifferenz angegeben.

Die hier zum Einsatz kommende Methode zur Ermittlung phasenaufgelöster Absorptionsspektren besteht in einer Vektor-PSD, die auf die gemessenen zeitaufgelösten Spektren angewendet wird. Wie bereits erwähnt, kommt der Algorithmus

4.4 Phasensensitive Detektion (PSD) bei Modulations-angeregter FTIR-Spektroskopie

erst nach der Aufnahme des gesamten Datensatzes zum Einsatz, wodurch keine wertvolle Messzeit verloren geht [100].

Alle Spektren werden als m-dimensionale Vektoren behandelt, welche die Intensitäten bzw. die Absorptionen bei m verschiedenen Wellenzahlen $\tilde{\nu}_i$ zu einer bestimmten Zeit t enthalten:

$$\vec{I}(t) = \begin{pmatrix} I(\tilde{\nu}_1, t) \\ I(\tilde{\nu}_2, t) \\ \dots \\ I(\tilde{\nu}_{m-1}, t) \\ I(\tilde{\nu}_m, t) \end{pmatrix}, \quad \vec{A}(t) = \begin{pmatrix} A(\tilde{\nu}_1, t) \\ A(\tilde{\nu}_2, t) \\ \dots \\ A(\tilde{\nu}_{m-1}, t) \\ A(\tilde{\nu}_m, t) \end{pmatrix} \quad (4.4.17)$$

Mit Beginn der Datenaufnahme werden n zeitaufgelöste Intensitätsspektren $\vec{I}_S(t_i)$; $i=0, \dots, n-1$ der Probe innerhalb einer Anregungsperiode T in äquidistanten Zeitintervallen $\Delta t = T/n$ aufgenommen (s. Abbildung 4.4.1):

$$\vec{I}_S(t_i) = \vec{I}_S(t = i \cdot T/n), \quad i = 0, \dots, n - 1 \quad (4.4.18)$$

Die Koaddition von Spektren über viele Anregungsperioden ist meist notwendig, um ein ausreichend gutes SNR zu erhalten. Sobald der stationäre Zustand erreicht, d.h. der anfängliche „Einschwingvorgang“ abgeschlossen ist, ist das Intensitätsspektrum am Ende einer Periode ($t=T$) identisch mit dem am Anfang der nächsten Periode ($t=0$), d.h. $\vec{I}_S(t_n) = \vec{I}_S(t_0)$.

Im nächsten Schritt geht es darum, Absorptionsspektren aus den Intensitätsspektren zu gewinnen. Da kein Referenzspektrum während des Modulationsexperimentes aufgenommen wird, stellt sich die Frage, wodurch das Referenzspektrum $I_R(\tilde{\nu})$ in Gleichung 4.4.1 ersetzt werden kann. Einerseits wäre es möglich, den Mittelwert aus allen Intensitätsspektren zu bilden. Es ist jedoch einfacher, direkt den Logarithmus des Intensitätsspektrums zu berechnen, dies bedeutet, dass ein sog. Pseudo-Referenzspektrum $I'_R(\tilde{\nu})=1$ benutzt wird. Das entsprechende Absorptionsspektrum, die Vektorelemente und das Pseudo-Referenzspektrum sind mit einem Strich gekennzeichnet.

$$A'(\tilde{\nu}, t_i) = -\log \frac{I_S(\tilde{\nu}, t_i)}{I'_R(\tilde{\nu})} = -\log I_S(\tilde{\nu}, t_i) \quad (4.4.19)$$

$$I'_R(\tilde{\nu}) = 1 \quad \forall \quad \tilde{\nu}$$

Die Fourierkomponenten von $A'(t, \tilde{\nu})$ werden mit dem PSD-Algorithmus aus Gleichung 4.4.3 berechnet, wobei die Simpson-Regel für numerische Integration (Gleichung 4.4.20) benutzt wird:

$$\begin{aligned} \int_0^T y(t) dt &\approx \frac{\Delta t}{3} (y_0 + 4y_1 + 2y_2 + 4y_3 + \dots + 2y_{n-2} + 4y_{n-1} + y_n) \\ &= \frac{\Delta t}{3} \sum_{i=0}^n s_i y_i \end{aligned} \tag{4.4.20}$$

s_i sind hierbei die Simpson-Koeffizienten, n muss gerade sein. Gemäß Gleichung 4.4.20 und Gleichung 4.4.10 lässt sich der DC-Anteil von \vec{A}'_0 ausrechnen:

$$\begin{aligned} A'_0(\tilde{\nu}) &= \frac{1}{T} \cdot \int_0^T A'(\tilde{\nu}, t) dt \\ &= \frac{\Delta t}{3n\Delta t} \sum_{i=0}^n s_i A'(\tilde{\nu}, t_i) = \frac{1}{3n} \sum_{i=0}^n s_i A'(\tilde{\nu}, t_i) \end{aligned} \tag{4.4.21}$$

Analog lassen sich der 0°- und der 90°-Anteil der Absorptionsspektren ausrechnen. Man erhält:

$$\begin{aligned} A_k^{0^\circ}(\tilde{\nu}) &= \frac{2}{T} \cdot \int_0^T A'(\tilde{\nu}, t) \sin(k\omega t) dt \\ &= \frac{2\Delta t}{3n\Delta t} \sum_{i=0}^n s_i A'(\tilde{\nu}, t_i) \sin\left(k \frac{2\pi}{T} \frac{iT}{n}\right) \\ &= \frac{2}{3n} \sum_{i=0}^n s_i A'(\tilde{\nu}, t_i) \sin\left(2\pi \frac{ki}{n}\right) \end{aligned} \tag{4.4.22}$$

4.4 Phasensensitive Detektion (PSD) bei Modulations-angeregter FTIR-Spektroskopie

$$\begin{aligned}
 A_k'^{90^\circ}(\tilde{\nu}) &= \frac{2}{T} \cdot \int_0^T A'(\tilde{\nu}, t) \cos(k\omega t) dt \\
 &= \frac{2}{3n} \sum_{i=0}^n s_i A'(\tilde{\nu}, t_i) \cos\left(2\pi \frac{ki}{n}\right)
 \end{aligned} \tag{4.4.23}$$

Diese Berechnungen zur Absorption wurden alle mit einer konstanten Referenz $\vec{I}_R = 1$ durchgeführt. Es wird anschließend gezeigt, dass nur der stationäre Anteil des PSD-Ergebnisses $A_0(\tilde{\nu})$ von der Wahl des Referenzspektrums abhängt, während die Modulationsspektren der Fundamentalfrequenz und der Obertöne davon unbeeinflusst bleiben.

$I_R(\tilde{\nu})$ sei ein beliebiges, zeitunabhängiges Referenzspektrum. Das mittlere Absorptionsspektrum \vec{A}_0 in Bezug auf dieses Referenzspektrum erhält man analog zu Gleichung 4.4.19:

$$\begin{aligned}
 A_0(\tilde{\nu}) &= -\log \frac{I_{S,0}(\tilde{\nu})}{I_R(\tilde{\nu})} \\
 &= -\log \frac{I_{S,0}(\tilde{\nu}) I_R'(\tilde{\nu})}{I_R(\tilde{\nu}) I_R(\tilde{\nu})} = A_0'(\tilde{\nu}) - \log \frac{1}{I_R(\tilde{\nu})} \\
 &= A_0'(\tilde{\nu}) + \log I_R(\tilde{\nu})
 \end{aligned} \tag{4.4.24}$$

Wie anschließend mit Gleichung 4.4.25 für $\vec{A}_k^{0^\circ}(\tilde{\nu})$ gezeigt wird, werden die Modulationsspektren $\vec{A}_k^{0^\circ}(\tilde{\nu})$ und $\vec{A}_k^{90^\circ}(\tilde{\nu})$, die durch PSD ermittelt werden (d.h. Berechnung der Fourierkoeffizienten mit $k > 0$) nicht von der Wahl von $I_R(\tilde{\nu})$ beeinflusst, denn der Term $\log I_R(\tilde{\nu}) \int_0^T \sin(k\omega t) dt$ verschwindet für alle k .

$$\begin{aligned}
 A_k^{0^\circ}(\tilde{\nu}) &= \frac{2}{T} \int_0^T A(\tilde{\nu}, t) \sin(k\omega t) dt \\
 &= \frac{2}{T} \int_0^T [A'(\tilde{\nu}, t) + \log I_R(\tilde{\nu})] \sin(k\omega t) dt \\
 &= \frac{2}{T} \int_0^T A'(\tilde{\nu}, t) \sin(k\omega t) dt \\
 &= A_k'^{0^\circ}(\tilde{\nu})
 \end{aligned} \tag{4.4.25}$$

Aus Gleichung 4.4.25 folgt, dass $\vec{A}_k^{0^\circ} = \vec{A}_k'^{0^\circ}$ und $\vec{A}_k^{90^\circ} = \vec{A}_k'^{90^\circ}$ gilt. Die Gleichungen 4.4.22 und 4.4.23 liefern demnach die korrekten Modulationsspektren $\vec{A}_k^{0^\circ}$ und $\vec{A}_k^{90^\circ}$.

Modulationsspektren $\vec{A}_k^{\phi_k^{PSD}}$ können für jeden beliebigen Phasenwinkel ϕ_k^{PSD} berechnet werden. Dazu muss Gleichung 4.4.13 gemäß Gleichung 4.4.20 numerisch integriert werden:

$$\begin{aligned}
 \vec{A}_k^{\phi_k^{PSD}}(\tilde{\nu}) &= \frac{2}{T} \cdot \int_0^T A(\tilde{\nu}, t) \sin(k\omega t + \phi_k^{PSD}) dt \\
 &= \frac{2}{3n} \sum_{i=0}^n s_i A(\tilde{\nu}, t_i) \sin\left(2\pi \frac{ki}{n} + \phi_k^{PSD}\right)
 \end{aligned} \tag{4.4.26}$$

Zwischen $\vec{A}_k^{\phi_k^{PSD}}(\tilde{\nu})$ und den orthogonalen Modulationsspektren $\vec{A}_k^{0^\circ}(\tilde{\nu})$ und $\vec{A}_k^{90^\circ}(\tilde{\nu})$ besteht der Zusammenhang aus Gleichung 4.4.14:

$$\vec{A}_k^{\phi_k^{PSD}}(\tilde{\nu}) = A_k^{0^\circ}(\tilde{\nu}) \cos(\phi_k^{PSD}) + A_k^{90^\circ}(\tilde{\nu}) \sin(\phi_k^{PSD}) \tag{4.4.27}$$

Die Phasenverschiebung für eine bestimmte Frequenz berechnet sich über

4.4 Phasensensitive Detektion (PSD) bei Modulations-angeregter FTIR-Spektroskopie

$$\varphi(\tilde{\nu}) = \arctan \frac{A_k^{90^\circ}(\tilde{\nu})}{A_k^{0^\circ}(\tilde{\nu})}, \quad A_k^{0^\circ}(\tilde{\nu}) > 0 \quad (4.4.28)$$

$$\varphi(\tilde{\nu}) = \arctan \frac{A_k^{90^\circ}(\tilde{\nu})}{A_k^{0^\circ}(\tilde{\nu})} + 180^\circ, \quad A_k^{0^\circ}(\tilde{\nu}) < 0 \quad (4.4.29)$$

wobei wegen $\tan \varphi = \tan(\varphi + 180^\circ)$ für $A_k^{0^\circ} < 0$ die zweite Gleichung gilt.

Die mathematische PSD-Prozedur wurde in die Auswertesoftware OPUS des FTIR-Spektrometers implementiert, wobei ein Makro der Gruppe von Prof. Fringeli (Wien) verwendet wird [95] (s. Anhang A.3.3).

Kapitel 5

Elektrochemie

5.1 Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS)

Die elektrochemische Impedanzspektroskopie (electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS) ist eine weit verbreitete Technik, welche bei Fragestellungen von elektrischen Eigenschaften unterschiedlichster Materialien eingesetzt wird. Traditionell wird die EIS zur Gewinnung von Informationen über Korrosionsprozesse, der Qualität von Filmüberzügen (Coatings), Elektrodenvorgängen z.B. in Batterien, der Charakterisierung von Halbleitern etc. eingesetzt. In den letzten Jahren fand sie verstärkten und mittlerweile weit verbreiteten Einsatz in der Biotechnologie.

Im Rahmen dieser Arbeit findet die Impedanzspektroskopie Anwendung in der Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften von künstlichen Membransystemen, insbesondere der Protein-verankerten Lipid-Membran. Dabei ist die Technik ein wichtiges Hilfsmittel, um die verschiedenen Präparationsschritte verfolgen zu können. So können Aussagen darüber gemacht werden, ob sich die elektrischen Eigenschaften bei einem bestimmten Präparationsschritt so verändert haben, wie dies erwartet wird. Wichtig ist das z.B. bei der Rekonstitution der Protein-Schicht in eine Membran. Hierdurch sollte der Widerstand deutlich ansteigen, die Kapazität sollte sinken. Auch die absoluten Werte geben Auskunft über eine gelungene Präparation.

Mit Hilfe der elektrischen Impedanzspektroskopie können die elektrischen Materialeigenschaften in der Bulkphase oder an der Grenzfläche zu einem elektrischen Leiter (Elektrode) untersucht werden. Die elektrische Impedanzspektroskopie be-

ruht auf der Messung der Phase und Amplitude der Stromantwort, die eine Probe auf eine angelegte Wechselspannung gibt. Die Stromantwort beinhaltet Informationen über die elektrischen Eigenschaften des Systems, insbesondere an den Grenzflächen. Mit Hilfe dieser Informationen kann sowohl der Aufbau des Systems als auch die Dynamik bewegter Ladungen analysiert werden [103]. Es ist heutzutage möglich, Impedanzen im Frequenzbereich von einigen Millihertz bis zu einigen Megahertz zu bestimmen. In unterschiedlichen Frequenzbereichen werden dabei Informationen über verschiedene Teile des zu untersuchenden Systems gewonnen. Beispielsweise ist wegen $|Z| = \frac{1}{\omega C}$ die Impedanz eines kapazitiven Elementes bei niedrigen Frequenzen hoch. Bei höheren Frequenzen sinkt sie, so dass dann evtl. ein anderer Widerstand zum Vorschein kommt.

5.1.1 Die elektrische Doppelschicht

Als ideal polarisierte Elektrode (IPE) wird eine solche Elektrode definiert [104], bei der kein Ladungstransfer über die Grenzfläche Metall-Lösung stattfindet. Eine Goldoberfläche in einem Elektrolyten verhält sich wie eine IPE. Da Ladungen nicht die Oberfläche einer IPE durchqueren können, verhält sich die Grenzfläche zwischen der Elektrode und der Lösung wie ein Kondensator. Hierdurch kommt es zur Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht. Das einfachste Modell für eine solche Doppelschicht wurde von Helmholtz entwickelt. Nach diesem Modell besteht die Doppelschicht aus einer einfachen Ionen-Schicht direkt über der Elektrode (s. Abbildung 5.1.1 (a)).

Im Laufe der Zeit hat sich ein differenzierteres Bild durchgesetzt: nach diesem besteht die Doppelschicht auf der Seite der Lösung aus mehreren unterteilten Zonen (s. Abbildung 5.1.1 (b)): Die Zone, welche der Elektrode am nächsten ist, enthält Lösungsmittelmoleküle und weitere Ionen, die *spezifisch* auf der Elektrode adsorbiert sind. Diese innere Schicht wird „Helmholtzschicht“ bzw. kompakte oder auch Sternschicht genannt. Der Abstand dieser Schicht von der Elektrode wird „Innere Helmholtz-Ebene“ (inner Helmholtz plane, IHP) genannt (s. Abbildung 5.1.1 (b)). Gelöste Ionen können sich der Elektrode nur bis auf einen Abstand x_2 nähern, der „Äußere Helmholtz-Ebene“ (outer Helmholtz plane, OHP) genannt wird. Die Anlagerung dieser Ionen wird als *unspezifische* Adsorption bezeichnet. Aufgrund von thermischer Bewegung in der Lösung sind die unspezifisch absor-

5.1 Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS)

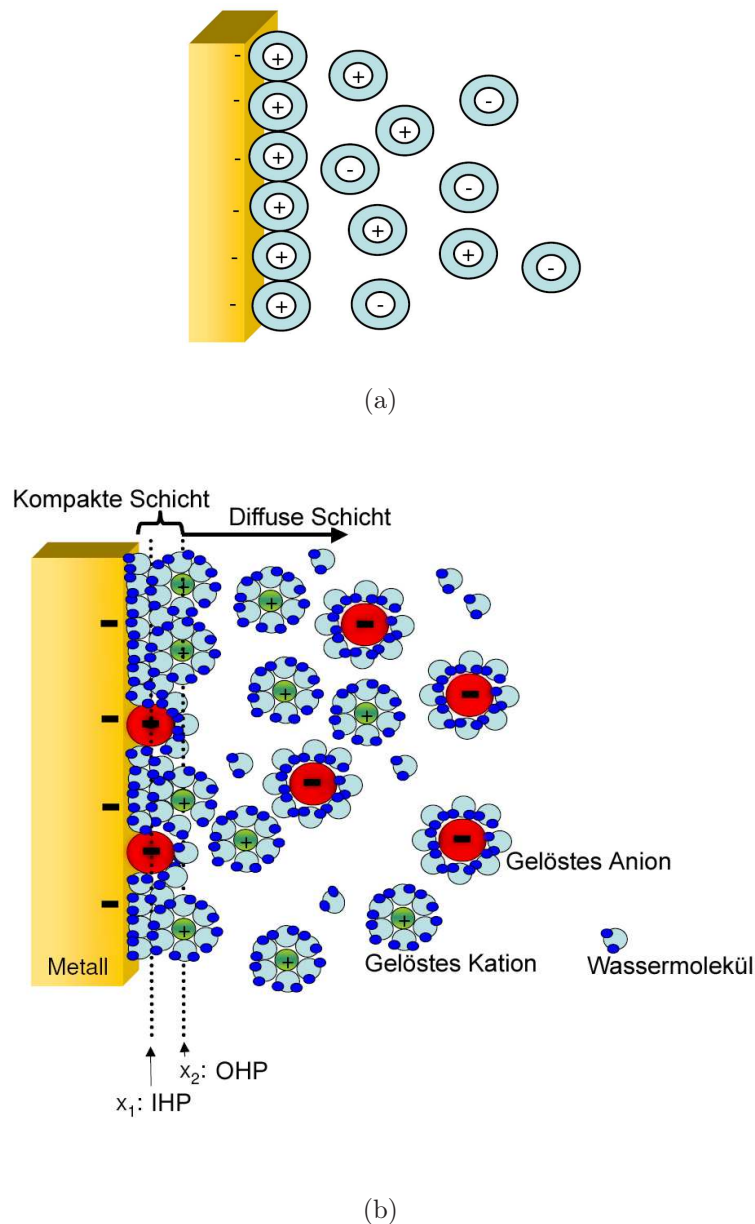


Abbildung 5.1.1: (a) Im einfachen Helmholtz-Modell einer elektrischen Doppelschicht lagert sich an einer negativ geladenen Elektrode eine Schicht aus positiven Ionen an; (b) ein differenzierteres Modell für die Doppelschicht-Region: Es bildet sich auf der Seite der Lösung eine kompakte Schicht aus spezifisch adsorbierten Ionen (im gezeigten Fall Anionen) und Lösungsmitteln. Unspezifisch adsorbierte Ionen sind über die diffuse Schicht verteilt.

bierten Ionen in einer Region verteilt, welche als „diffuse Schicht“ bezeichnet wird.

5.1.2 Messprinzip der elektrochemischen Impedanzspektroskopie

Als Impedanz bezeichnet man den Wechselstromwiderstand eines Systems. Die Gesamtimpedanz setzt sich dabei aus den Ohmschen Widerständen und den Widerständen der kapazitiven und induktiven Elemente zusammen ¹. Kapazitive und induktive Elemente verursachen eine Phasenverschiebung zwischen der anregenden Spannung und der Stromantwort, welche sich in der mathematischen Beschreibung der Wechselstromprozesse als Imaginärteil der Größen bemerkbar macht.

Das zu untersuchende System wird mit einem elektrischen Signal angeregt („gestört“), meist einer sinusförmigen Wechselspannung im Frequenzbereich 10^{-3} bis 10^6 Hz. Die resultierende Stromantwort wird aufgezeichnet und analysiert. Dabei wird mit einer Drei-Elektroden-Anordnung gearbeitet. An die Arbeitselektrode (working Electrode, WE) wird die Wechselspannung angelegt. Mit der Gegenelektrode (counter Electrode, CE) wird das Antwortsignal aufgezeichnet. Die Referenzelektrode (RE) wird als Referenzpunkt benötigt, um die Potentialdifferenz zu messen, wobei zwischen Arbeits- und Referenzelektrode hochohmig gemessen werden und durch die Referenzelektrode ein sehr kleiner Strom fließen muss, um einen Ohmschen Spannungsabfall möglichst zu vermeiden. Die am häufigsten verwendete Störung besteht in einer Modulation einer kleinen Amplitude E_0 von 5-10 mV mit o.g. Frequenz ω zwischen 10^{-3} und 10^6 Hz (Gleichung 5.1.1). Eine kleine Spannung $<25\text{mV}$ gewährleistet gemäß [103] weitestgehend die Vermeidung von Nichtlinearitäten in der Stromantwort (in Gleichung 5.1.2 sind keine nichtlinearen Terme enthalten).

$$E(t) = E_0 \cdot \sin(\omega t) \tag{5.1.1}$$

Der Antwortstrom $I(t)$ ist mit der Phase Φ verschoben und hat eine Amplitude I_0 bei gleicher Frequenz ω :

¹Induktive Elemente werden hier nicht behandelt, da sie in den behandelten Systemen in der Regel nicht auftreten.

5.1 Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS)

$$I(t) = I_0 \cdot \sin(\omega t + \Phi) \quad (5.1.2)$$

Mit folgender Gleichung wird die Impedanz berechnet:

$$Z(t) = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 \cdot \sin(\omega t)}{I_0 \cdot \sin(\omega t + \Phi)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \Phi)} \quad (5.1.3)$$

Gemäß der Eulerschen Relation $e^{i\Phi} = \cos \Phi + i \sin \Phi$ lassen sich die Wechselstrom-Größen komplex schreiben, was eine mathematische Behandlung erheblich vereinfacht:

$$E(t) = E_0 \cdot e^{i\omega t} \quad (5.1.4)$$

$$I(t) = I_0 \cdot e^{i\omega t - \Phi} \quad (5.1.5)$$

$$Z(t) = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 \cdot e^{i\omega t}}{I_0 \cdot e^{i\omega t - \Phi}} = \frac{E_0}{I_0} \cdot e^{i\Phi} = |Z| \cdot e^{i\Phi} = Z' + iZ'' \quad (5.1.6)$$

Gemäß Gleichung 5.1.6 ist die Impedanz zeitunabhängig, gleichzeitig ist sie aber frequenzabhängig (s.u.).

Realteil (Resistanz) und Imaginärteil (Reaktanz) der komplexen Impedanz sind nach der Eulerschen Relation gegeben durch

$$Z' = \Re(Z) = |Z| \cdot \cos \Phi \quad (5.1.7)$$

$$Z'' = \Im(Z) = |Z| \cdot \sin \Phi \quad (5.1.8)$$

Die komplexe Impedanz ist in Abbildung 5.1.2 in der komplexen Ebene dargestellt.

Weiterhin gelten folgende Relationen:

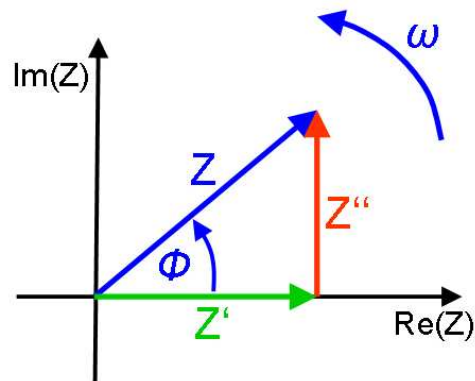


Abbildung 5.1.2: Impedanz in der komplexen Ebene. Z' ist der Realteil, Z'' ist der Imaginärteil von Z .

$$|Z| = \sqrt{(Z')^2 + (Z'')^2} \quad (5.1.9)$$

$$\Phi = \arctan\left(\frac{Z''}{Z'}\right) \quad (5.1.10)$$

Der Kehrwert der Impedanz ist die Admittanz Y , was einer komplexen Leitfähigkeit entspricht. Die Beziehungen zwischen dem Real- und Imaginärteil der Admittanz (Konduktanz bzw. Suszeptanz) und Resistanz und Reaktanz sind in den Gleichungen 5.1.13 und 5.1.14 gegeben.

$$Y = Y' + iY'' = \frac{1}{Z} \quad (5.1.11)$$

$$= \frac{1}{Z' + iZ''} = \frac{Z'}{(Z')^2 + (Z'')^2} - \frac{iZ''}{(Z')^2 + (Z'')^2} \quad (5.1.12)$$

$$Y' = \frac{Z'}{(Z')^2 + (Z'')^2} \quad (5.1.13)$$

$$Y'' = -\frac{iZ''}{(Z')^2 + (Z'')^2} \quad (5.1.14)$$

5.1.3 Die verschiedenen Darstellungsarten für Impedanzspektren

In der elektrochemischen Impedanzspektroskopie werden in verschiedenen Darstellungsarten zwei Parameter gegeneinander aufgetragen.

Bode-Plot Eine sehr gebräuchliche und auch im Rahmen dieser Arbeit verwendete Darstellungsform ist der Bode-Plot, bei dem die Phase Φ und der Betrag der Impedanz $|Z|$ in Abhängigkeit von der Anregungsfrequenz ω aufgetragen werden ($\omega \rightarrow \Phi$, $\omega \rightarrow |Z|$). Da die Frequenz über etliche Größenordnungen verändert wird und sich auch die Impedanz oft über mehrere Größenordnungen ändert, wird für diese beiden Größen eine logarithmische Skala gewählt.

Impedanz-Plot bzw. Nyquist-Plot Eine andere Form der Darstellung ist der Nyquist-Plot, bei dem der negative Imaginärteil der Impedanz in Abhängigkeit vom Realteil der Impedanz aufgetragen wird ($Z' \rightarrow Z''$).

Frequenzreduzierter Admittanz-Plot Die dritte hier zu präsentierende Darstellungsform ist der frequenzreduzierte Admittanzplot, bei dem Y' und Y'' jeweils durch die Frequenz ω dividiert werden und Y''/ω in Abhängigkeit von Y'/ω aufgetragen wird ($Y'/\omega \rightarrow Y''/\omega$).

Für die Auswertung der Impedanzspektren werden elektrische Ersatzschaltkreise benutzt, die den physikalischen Eigenschaften des zu analysierenden Systems entsprechen. Die Parameter des Ersatzschaltkreises werden dann variiert, um das Impedanzspektrum anzufitten.

5.1.4 Schaltkreiselemente

Durch Analyse der Kurven können Aussagen über den kapazitiven und den Ohmschen Anteil eines Systems gemacht werden.

Ohmscher Widerstand (R) Ist der Phasenwinkel null und ändert sich mit der Frequenz nicht, so liegt ein rein Ohmsches System vor, denn ein Ohmscher Widerstand ist frequenzunabhängig.

Kapazität (C) Bei einem rein kapazitiven System beträgt der Phasenwinkel bei jeder Frequenz -90° , denn für einen Kondensator im Wechselstromkreis gilt

$$Z(C) = -\frac{i}{\omega C}, \quad (5.1.15)$$

so dass $\Re(Z) = Z'$ stets null ist, $\Im(Z) = Z''$ dagegen stets negativ und ungleich null, weswegen $\Phi = \arctan\left(\frac{Z''}{Z'}\right) = -90^\circ$ gilt.

Für gemischte Systeme (wie in der Realität stets der Fall) kommt es frequenzabhängig zu Überlagerungen von Ohmschen und kapazitiven Effekten.

Konstantes Phasenelement (CPE) Die zu analysierenden Systeme enthalten oft Kapazitäten, die von einer idealen Kapazität abweichen und eine Verteilung von Kapazitäten darstellen. Die Impedanz eines CPE-Elementes ist folgendermaßen definiert:

$$Z_{CPE} = \frac{A}{(i\omega)^\alpha} \quad (5.1.16)$$

A ist hierbei eine frequenz-unabhängige reelle Konstante. Für α gilt: $0 < \alpha < 1$. Über die physikalische Natur der Elemente, die durch ein CPE beschrieben werden, gibt es verschiedene Theorien. So könnten z.B. mikroskopische Materialeigenschaften wie Ecken, Kanten oder Stufen auf der Oberfläche Inhomogenitäten im kapazitiven Element bewirken. Je näher der Wert für α bei 1 liegt, desto mehr entspricht das CPE einem Kondensator. In vorliegender Arbeit werden für α Werte bei 0,9 gefunden, wobei eine gemischte Spacerregion unter einer Protein-verankerten Lipid-Membran durch ein CPE beschrieben wird.

5.1.5 Beispiele einfacher Ersatzschaltkreise

In diesem Abschnitt sollen exemplarisch einige Ersatzschaltkreise präsentiert werden, um anschließend ein besseres Verständnis für die Impedanzspektren der realen Systeme zu haben. Die abgebildeten Impedanzspektren wurden mit dem Programm ZView simuliert [16].

5.1 Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS)

5.1.5.1 Reiner Ohmscher Widerstand

Im Falle eines reinen Ohmschen Widerstandes berechnen sich die Parameter der drei hier verwendeten Darstellungsweisen wie folgt:

Parameter für den Nyquist-Plot:

$$Z_R = \frac{E}{I} = R \quad (5.1.17)$$

$$\implies Z'_R = R \quad (5.1.18)$$

$$\text{und } Z''_R = 0 \quad (5.1.19)$$

Somit erhält man nur ein Wertepaar $(Z'/Z'')=(R/0)$ (s. Abbildung 5.1.3 links unten).

Die Parameter für den frequenzreduzierten Admittanz-Plot berechnen sich wie folgt:

$$Y_R = \frac{1}{Z_R} = \frac{1}{R} \quad (5.1.20)$$

$$\implies \frac{Y'_R}{\omega} = \frac{1}{\omega \cdot R} \quad (5.1.21)$$

$$\text{und } \frac{Y''_R}{\omega} = 0 \quad (5.1.22)$$

Der frequenzreduzierte Admittanz-Plot ist in Abbildung 5.1.3 rechts oben dargestellt. Da $\frac{Y''}{\omega}$ für alle Frequenzen null ist, erhält man eine Gerade parallel zur $\frac{Y'}{\omega}$ -Achse mit frequenzabhängigen Werten für $\frac{Y'}{\omega}$.

Als Parameter für den Bode-Plot erhält man mit Hilfe der Gleichungen 5.1.18

und 5.1.19:

$$|Z| = \sqrt{(Z')^2 + (Z'')^2} = R \quad (5.1.23)$$

$$\Phi = \arctan\left(\frac{Z''}{Z'}\right) = 0 \quad (5.1.24)$$

Damit sind $|Z|$ und Φ frequenzunabhängig. Dies ist in der Bode-Darstellung in Abbildung 5.1.3 rechts unten graphisch dargestellt.

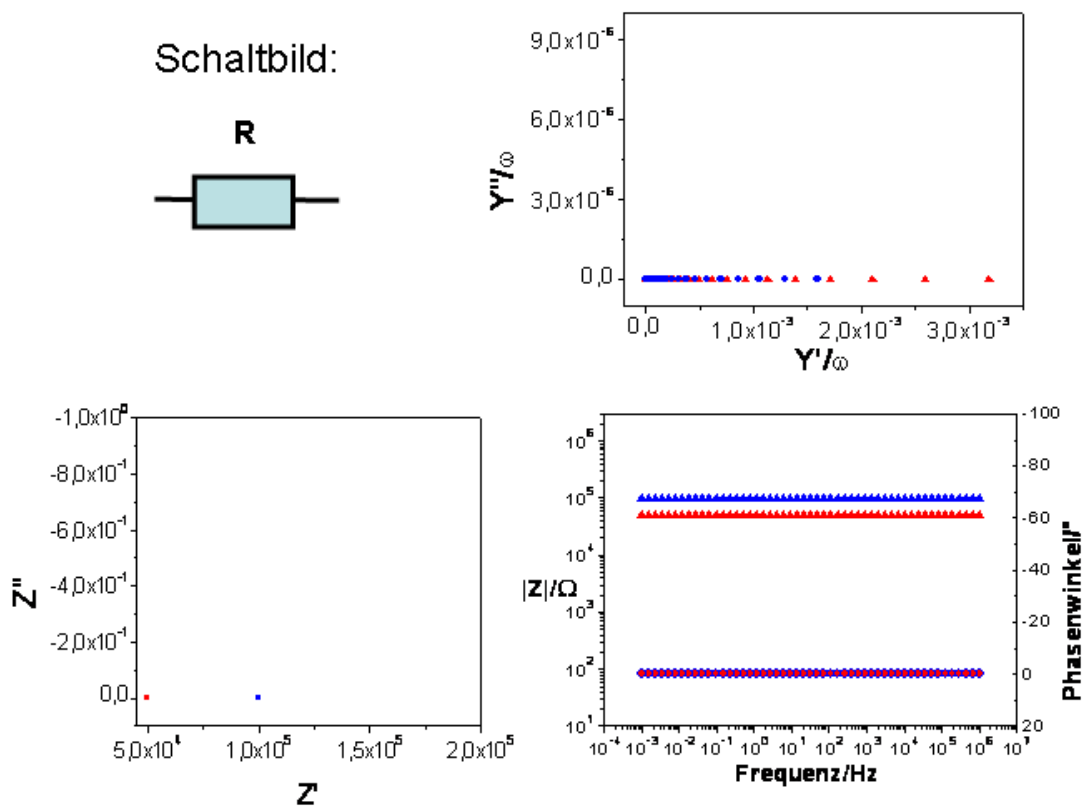


Abbildung 5.1.3: Impedanzspektren für eine Schaltung mit einem Ohmschen Widerstand. Links unten: Nyquist-Plot, rechts oben: frequenzreduzierter Admittanzplot, rechts unten: Bode-Plot ($\Phi(\omega)$: Kreise, $|Z|(\omega)$: Dreiecke). Als Beispiel für die Simulation wurde ein Widerstand mit $R=50 \text{ k}\Omega$ (rot) bzw. $R=100 \text{ k}\Omega$ (blau) gewählt.

5.1 Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS)

5.1.5.2 Reiner Kondensator

Für die Impedanz eines rein kapazitiven Elementes gilt Gleichung 5.1.15:

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

Aus der rein imaginären Impedanz folgt unmittelbar

$$Z'_C = 0 \quad (5.1.25)$$

$$\text{und} \quad Z''_C = -\frac{1}{\omega C} \quad (5.1.26)$$

Somit ist Z' für alle Frequenzen null und man erhält in der Nyquist-Darstellung eine Gerade parallel zur Z'' -Achse mit frequenzabhängigen Werten für Z'' (s. Abbildung 5.1.4 links unten).

Die Parameter des frequenzreduzierten Admittanz-Plots berechnen sich wie folgt:

$$Y_C = \frac{1}{Z_C} = i\omega C \quad (5.1.27)$$

$$\implies \frac{Y'_C}{\omega} = 0 \quad (5.1.28)$$

$$\text{und} \quad \frac{Y''_C}{\omega} = C \quad (5.1.29)$$

Damit erhält man ein einziges Wertepaar für den frequenzreduzierten Admittanz-Plot, in diesen Fall $(\frac{Y'}{\omega} / \frac{Y''}{\omega}) = (0/C)$ (s. Abbildung 5.1.4 rechts oben).

Die Parameter für den Bode-Plot sind für das rein kapazitive Element sind die folgenden:

$$|Z| = \sqrt{(Z')^2 + (Z'')^2} = \frac{1}{\omega C} \quad (5.1.30)$$

$$\Phi = \arctan\left(\frac{Z''}{Z'}\right) = -90^\circ \quad (5.1.31)$$

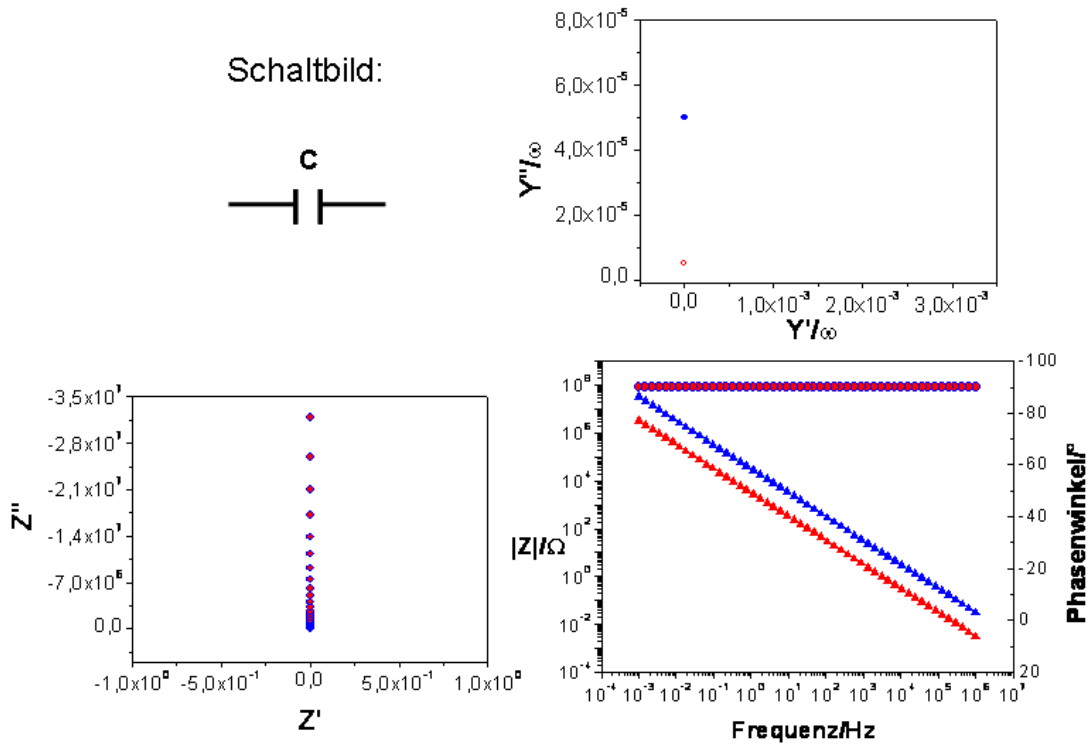


Abbildung 5.1.4: Impedanzspektren für eine Schaltung mit einem Kondensator. Links unten: Nyquist-Plot, rechts oben: frequenzreduzierter Admittanzplot, rechts unten: Bode-Plot ($\Phi(\omega)$: Kreise, $|Z|(\omega)$: Dreiecke). Als Beispiel für die Simulation wurde eine Kapazität mit $C=5 \mu\text{F}$ (rot) bzw. $C=50 \mu\text{F}$ (blau) gewählt.

Die beiden Darstellungen des Bode-Plots sind in Abbildung 5.1.4 rechts unten abgebildet. Die Phase beträgt für alle Frequenzen -90° , für den Betrag der Impedanz ergibt sich ein antiproportionaler Zusammenhang, welcher in der doppelt-logarithmischen Darstellung durch eine Gerade abgebildet wird.

„Interessanter“ als diese simplen Fälle im Hinblick auf die Ersatzschaltkreise für biomimetische Systeme sind Kombinationen aus Ohmschem Widerstand und Kondensator:

5.1 Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS)

5.1.5.3 Reihenschaltung aus Widerstand und Kondensator

In dieser Schaltung zeigen sich bereits einige Eigenschaften von Systemen mit mehreren unterschiedlichen Schaltkreiselementen. So steigt beispielsweise die Impedanz für kleine Frequenzen stark an, da sich der kapazitive Widerstand in diesem Bereich bemerkbar macht, für hohe Frequenzen spielt hingegen der Ohmsche Widerstand eine Rolle.

Die Impedanz berechnet sich folgendermaßen, wobei die Kirchhoffschen Gesetze gelten:

$$Z = Z_R + Z_C = R - \frac{i}{\omega C} \quad (5.1.32)$$

$$\implies Z' = R \quad (5.1.33)$$

$$\text{und } Z'' = -\frac{1}{\omega C} \quad (5.1.34)$$

Der Nyquist-Plot in Abbildung 5.1.5 links unten zeigt eine Gerade parallel zur Z'' -Achse, da Z' frequenzunabhängig ist. Der Schnittpunkt mit der Z' -Achse liegt bei $Z'=R$.

Für die Admittanz ergeben sich folgende Zusammenhänge (s. Gleichungen 5.1.11-5.1.14):

$$Y = \frac{1}{Z} = \frac{1}{R - \frac{i}{\omega C}} = \frac{R + \frac{i}{\omega C}}{R^2 + \frac{1}{\omega^2 C^2}} \quad (5.1.35)$$

$$= \frac{R}{R^2 + \frac{1}{\omega^2 C^2}} + i \cdot \frac{\frac{1}{\omega C}}{R^2 + \frac{1}{\omega^2 C^2}} \quad (5.1.36)$$

$$\implies Y' = \frac{R}{R^2 + \frac{1}{\omega^2 C^2}} \quad (5.1.37)$$

$$Y'' = \frac{\frac{1}{\omega C}}{R^2 + \frac{1}{\omega^2 C^2}} \quad (5.1.38)$$

$Y'(\omega)$ und $Y''(\omega)$ sind die Variablen der Parameterdarstellung eines Kreises (s.

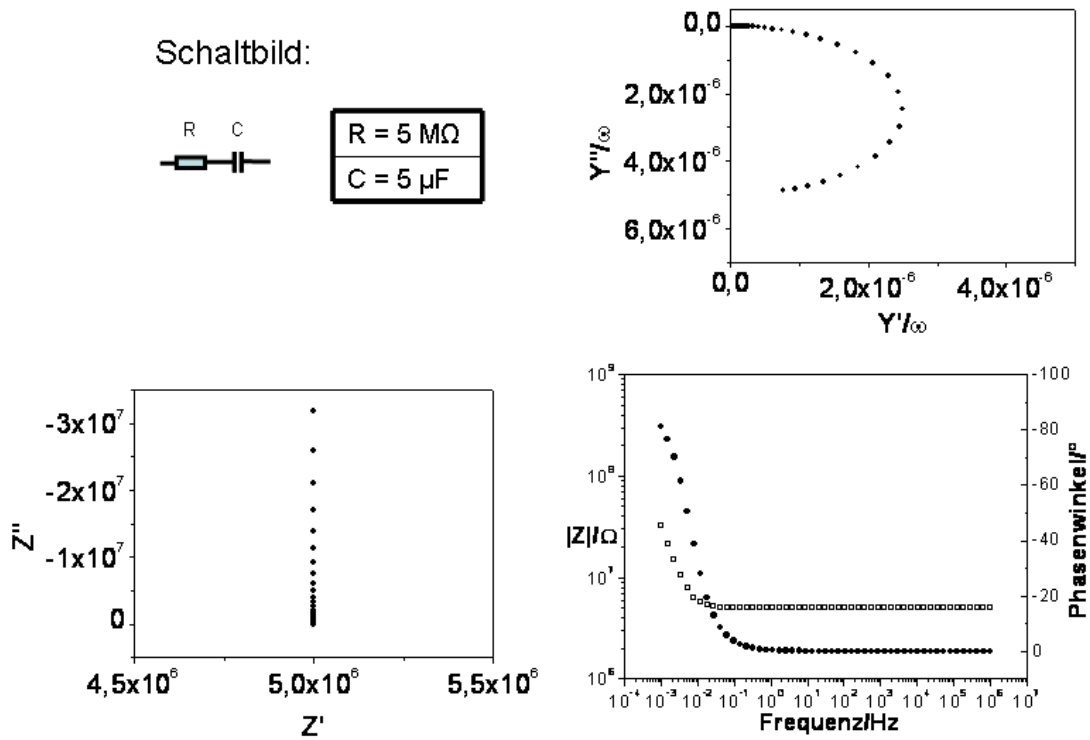


Abbildung 5.1.5: Impedanzspektren für eine Reihenschaltung aus Ohmschem Widerstand und Kapazität. Links unten: Nyquist-Plot, rechts oben: frequenzreduzierter Admittanzplot, rechts unten: Bode-Plot ($\Phi(\omega)$: gefüllte schwarze Kreise, $|Z|(\omega)$: offene Vierecke). Als Beispiel für die Simulation wurde ein Ohmscher Widerstand mit $R=5 \text{ M}\Omega$ und eine Kapazität mit $C=5 \text{ }\mu\text{F}$ gewählt.

Abbildung 5.1.5 rechts oben). Die Schnittpunkte des Kreises mit der $\frac{Y''}{\omega}$ -Achse liegen bei $\frac{Y''}{\omega}=0$ und bei $\frac{Y''}{\omega}=C$, weswegen sich die Kapazität direkt am Graphen ablesen lässt.

Für die Parameter des Bode-Plots erhält man folgende Werte:

5.1 Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS)

$$|Z| = \sqrt{R^2 + \left(-\frac{1}{\omega C}\right)^2} = \sqrt{R^2 + \frac{1}{\omega^2 C^2}} \quad (5.1.39)$$

$$\Phi = \arctan\left(\frac{-\frac{1}{\omega C}}{R}\right) = \arctan\left(-\frac{1}{RC\omega}\right) \quad (5.1.40)$$

Aus diesen Zusammenhängen folgt, dass sich die Impedanz für kleine Werte ω dem Wert $\frac{1}{\omega C}$ annähert. Im Limes für $\omega \rightarrow \infty$ hingegen nähert sich $|Z|$ dem Ohmschen Widerstand R an. Für die Phase gilt $\Phi \rightarrow -90^\circ$ für $\omega \rightarrow 0$ und $\Phi \rightarrow 0^\circ$ für $\omega \rightarrow \infty$. Diese Zusammenhänge sind im Bode-Plot (Abbildung 5.1.5 rechts unten) zu erkennen.

5.1.5.4 Parallelschaltung aus Widerstand und Kondensator

In diesem Fall berechnet sich die Impedanz gemäß den Gleichungen 5.1.41 bis 5.1.44, wobei die sich in einer Parallelschaltung die Impedanzen reziprok addieren:

$$Z = \frac{1}{\frac{1}{R} + \frac{1}{R_C}} = \frac{1}{\frac{1}{R} + i\omega C} = \frac{\frac{1}{R} - i\omega C}{\frac{1}{R^2} + \omega^2 C^2} \quad (5.1.41)$$

$$= \frac{\frac{1}{R}}{\frac{1}{R^2} + \omega^2 C^2} - i \cdot \frac{\omega C}{\frac{1}{R^2} + \omega^2 C^2} \quad (5.1.42)$$

$$\Rightarrow Z' = \frac{\frac{1}{R}}{\frac{1}{R^2} + \omega^2 C^2} = \frac{R}{1 + R^2 \omega^2 C^2} \quad (5.1.43)$$

$$Z'' = -\frac{\omega C}{\frac{1}{R^2} + \omega^2 C^2} = \frac{-R^2 \omega C}{1 + R^2 \omega^2 C^2} \quad (5.1.44)$$

In diesem Fall sind $Z'(\omega)$ und $Z''(\omega)$ die Variablen für die Parameterdarstellung eines Kreises. Der Kreis schneidet die Z' -Achse an den Stellen $Z'=0$ und $Z'=R$, so dass man am Graphen direkt den Widerstand R ablesen kann (s. Abbildung 5.1.6 links unten).

Für die Parameter der Darstellung der frequenzreduzierten Admittanz erhält man folgende Ausdrücke:

$$Y = \frac{1}{Z} = \frac{1}{R} + i\omega C \quad (5.1.45)$$

$$\Rightarrow \frac{Y'}{\omega} = \frac{1}{R\omega} \quad (5.1.46)$$

$$\text{und} \quad \frac{Y''}{\omega} = C \quad (5.1.47)$$

Demnach erhält man im frequenzreduzierten Admittanz-Plot eine Gerade parallel zur $\frac{Y''}{\omega}$ -Achse, die die $\frac{Y'}{\omega}$ -Achse bei C schneidet (s. Abbildung 5.1.6 rechts oben). Die Parameter für den Bode-Plot berechnen sich folgendermaßen:

$$|Z| = \sqrt{\left(\frac{R}{1 + R^2\omega^2C^2}\right)^2 + \left(-\frac{R^2\omega C}{1 + R^2\omega^2C^2}\right)^2} = \frac{\sqrt{R^2 + R^4\omega^2C^2}}{1 + R^2\omega^2C^2} \quad (5.1.48)$$

$$\Phi = \arctan\left(\frac{-\frac{R^2\omega C}{1 + R^2\omega^2C^2}}{\frac{R}{1 + R^2\omega^2C^2}}\right) = \arctan(-R\omega C) \quad (5.1.49)$$

Für $\omega \rightarrow 0$ gilt $|Z| \rightarrow R$ und $\Phi \rightarrow 0$. Im Limes $\omega \rightarrow \infty$ gilt $|Z| \rightarrow \frac{1}{\omega C}$ und $\Phi \rightarrow -90^\circ$ (s. Abbildung 5.1.6 unten rechts.)

5.1.5.5 Ersatzschaltbild für ein RC-Glied mit vorgeschaltetem Ohmschen Widerstand

Dieser Ersatzschaltkreis beschreibt einen idealen Monolayer (z.B. eine geschlossene Schicht aus Alkanthiolen auf einer Goldoberfläche). Das RC-Glied, eine Parallelschaltung aus einem Ohmschen Widerstand und Kondensator, ist mit einem weiteren Ohmschen Widerstand in Reihe geschaltet. Das RC-Glied repräsentiert den Monolayer mit einer Kapazität C und einem Ohmschen Widerstand R_2 , die Pufferlösung wird durch den Ohmschen Widerstand R_1 beschrieben. Dieser Widerstand leuchtet wegen der endlichen Leitfähigkeit der Pufferlösung sofort ein. Doch auch der Monolayer hat neben seiner Kapazität einen endlichen Ohmschen Widerstand, da bei angelegter Spannung immer auch Ladungen durch diese

5.1 Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS)

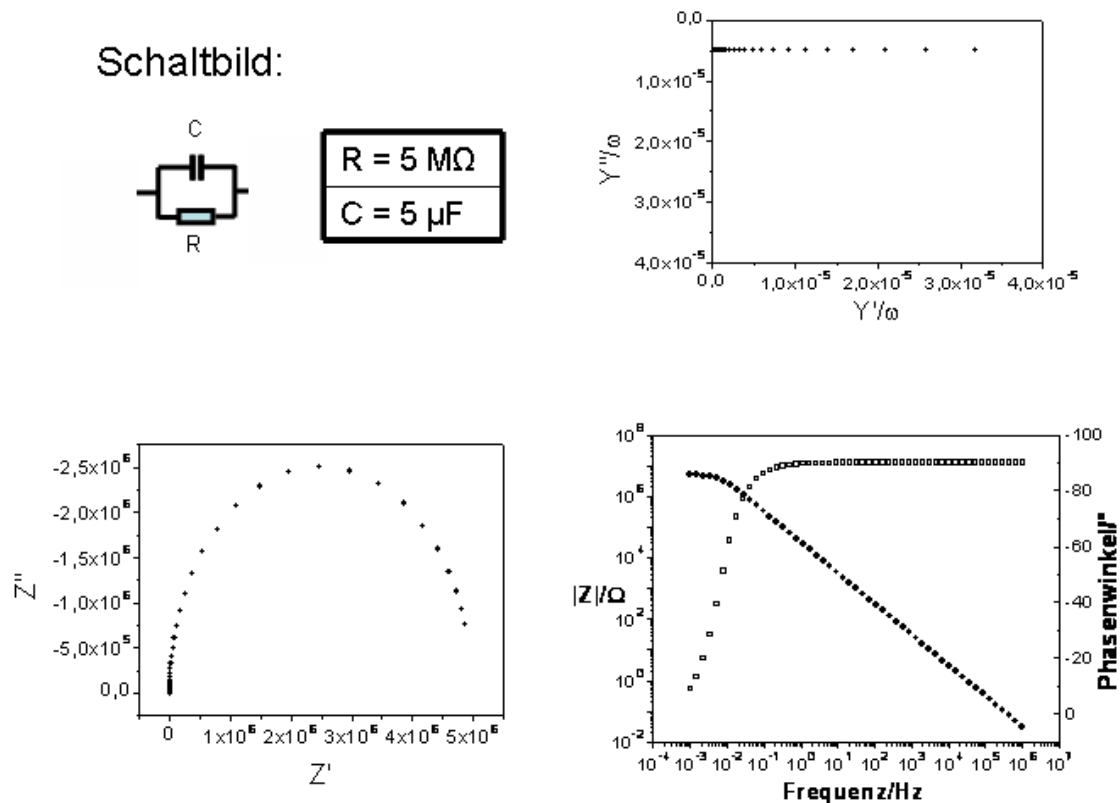


Abbildung 5.1.6: Impedanzspektren für eine Parallelschaltung aus Ohmschem Widerstand und Kapazität. Links unten: Nyquist-Plot, rechts oben: frequenzreduzierter Admittanzplot, rechts unten: Bode-Plot ($\Phi(\omega)$: offene Vierecke, $|Z|(\omega)$: gefüllte schwarze Kreise). Als Beispiel für die Simulation wurde ein Ohmscher Widerstand mit $R=5 \text{ M}\Omega$ und eine Kapazität mit $C=5 \text{ }\mu\text{F}$ gewählt.

Schicht fließen. Die Berechnung der Parameter, die in den vorangegangenen Abschnitten stets vorgenommen wurde, ist für dieses System langwierig (wenn auch einfach), weswegen die Herleitung hier nicht durchgeführt wird. Anschaulich wird klar, wie sich das System in den unterschiedlichen Frequenzbereichen verhält.

Man kann folgendes Verhalten im Bode-Plot beobachten und wie folgt erklären (Abbildung 5.1.7 (Mitte)): Bei hohen Frequenzen ist der kapazitive Widerstand klein, weswegen der Strom im RC-Glied über den Kondensator fließt und R_2 keine Rolle spielt. Der Gesamtwiderstand ist dann durch R_1 gegeben. gleichzeitig gibt es wegen des fehlenden kapazitiven Einflusses keine Phasenverschiebung.

Verlangsamt man die Frequenz (auf der Skala bewegt man sich dabei nach links),

so lädt sich der Kondensator auf und die Kapazität macht sich (im gezeigten Beispiel ca. unterhalb 10^3 Hz) bemerkbar: Die Impedanz des Systems beginnt zu steigen, wobei die Abhängigkeit der Impedanz des RC-Gliedes von ω durch

$$Z = \frac{1}{\frac{1}{R_2} - i\omega C} \quad (5.1.50)$$

gegeben ist. Die Phasenverschiebung steigt auf 90° an. In diesem Bereich kann R_1 meist bereits vernachlässigt werden (im Beispiel von Abbildung 5.1.7 beträgt R_1 50Ω , was in etwa einem typischen Lösungsmittelwiderstand entspricht.) R_2 dagegen beginnt sich erst bemerkbar zu machen, sobald der kapazitive Widerstand in die Größenordnung von R_2 kommt. Für $R_2 < R_C$ fließt der Strom über R_2 , daher steigt die Impedanz nicht weiter an, sondern geht in Sättigung. Im Beispiel ist ca. dies für $\omega < 10^{-1}$ Hz der Fall. Die Phasenverschiebung geht in diesem Bereich wieder auf null zurück.

In Abbildung 5.1.7 sind auch wieder der frequenzreduzierte Admittanzplot (oben) und der Nyquist-Plot (unten) dargestellt, wobei wichtige Regionen der Kurven herausgezoomt wurden.

5.1.5.6 Ersatzschaltbild für zwei in Reihe geschaltete RC-Glieder mit vorgeschaltetem Ohmschen Widerstand

Dieses Ersatzschaltbild wird benutzt, um biomimetische Systeme mit mehreren Schichten unterschiedlicher elektrischer Eigenschaften zu beschreiben. Ein Beispiel ist das in der vorliegenden Arbeit benutzte System der Protein-verankerten Lipid-Membran. Dabei ist eine Schicht die Protein-Schicht mit der Lipid-Membran (in Abbildung 5.1.8 C_1 und R_2). Diese Schicht ist somit keine homogene Schicht, sie hat aber meist eine definierte effektive Kapazität und einen definierten Widerstand. Auch die Protein-Schicht vor Rekonstitution in eine Membran wird durch ein RC-Glied beschrieben. Durch Simulation des Systems vor und nach Ausbildung der Membran können die elektrischen Parameter der Schichten direkt miteinander verglichen werden. Die Ausbildung einer Membran sollte z.B. zu einem deutlich steigenden Wert für R_2 gegenüber der reinen Protein-Schicht bewirken. Eine zweite Schicht ist der Submembranraum, der durch Anker-moleküle bzw. Verdünnermoleküle charakterisiert ist. Das System ist in Abschnitt 3.5 beschrieben. Der submembrane Monolayer kann ebenfalls durch ein RC-Glied

5.1 Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS)

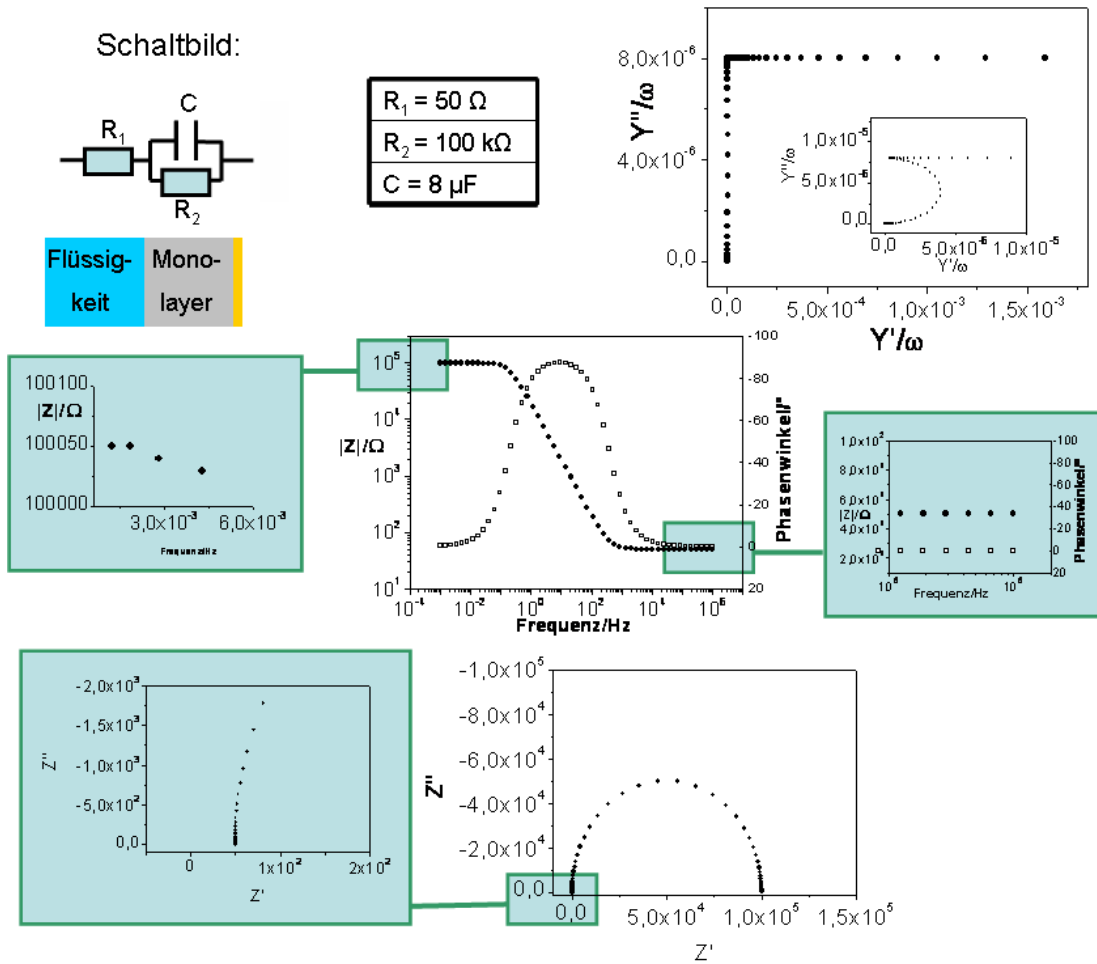


Abbildung 5.1.7: Impedanzspektren für ein RC-Glied mit vorgeschaltetem Ohmschen Widerstand. Dieser Ersatzschaltkreis repräsentiert einen auf einer Elektrode assemblierten Monolayer. Oben: frequenzreduzierter Admittanzplot, Mitte: Bode-Plot ($\Phi(\omega)$: offene Vierecke, $|Z|(\omega)$: gefüllte schwarze Kreise), unten: Nyquist-Plot. Als Beispiel für die Simulation wurde als Ohmscher Lösungsmittel-Widerstand $R_1=50 \Omega$, für die Schicht $R_2=100 \text{ k}\Omega$ und $C=8 \mu\text{F}$ gewählt.

beschrieben werden (in Abbildung 5.1.8 C_2 und R_3). Durch die Verteilung der Moleküle ist es manchmal aber zielführender, statt der Kapazität ein CPE zu verwenden (Abschnitt 5.1.4).

Die Parameter der Schichten, die verschiedenen Impedanzen, Admittanzen und Kapazitäten, können äquivalent zu den vorangegangenen Abschnitten berechnet werden, wobei die Rechnungen durch das zusätzliche RC-Glied nochmals aufwändiger sind als im vorangegangenen Abschnitt und daher auch hier auf eine Herleitung verzichtet wird.

Die Argumentationen für das Verhalten der Kurven gelten analog zum letzten Abschnitt. Hier sei wieder eine kurze Diskussion des Bode-Plots angeführt:

Im Bode-Plot sind zwei Zeitkonstanten zu beobachten, welche den beiden RC-Gliedern entsprechen. Für hohe Frequenzen ist die Impedanz wieder durch den Lösungsmittelwiderstand R_1 bestimmt, da die Kondensatoren sich in diesem Frequenzbereich noch nicht aufladen. Zu langsameren Frequenzen gehend, macht sich zuerst die eine Kapazität bemerkbar. Die Impedanz beginnt zu steigen (in Abbildung 5.1.8 ca. unterhalb von $\omega = 10^{-3}$ Hz), ebenso die Phasenverschiebung, welche idealerweise -90° erreicht. Kommt der Wert von R_C in den Bereich des Ohmschen Widerstandes desselben RC-Gliedes, so geht die Impedanzkurve in Sättigung, d.h. sie steigt nicht weiter an, ebenso sinkt die Phasenverschiebung wieder. In der Abbildung sieht man den letztgenannten Effekt für die Impedanzkurve allerdings kaum, da sich ab ca. 10^{-1} das zweite RC-Glied bemerkbar macht. Die Impedanzkurve weist in diesem Bereich eine leichte „Delle“ auf, die Kurve der Phasenverschiebung zeigt einen zweiten Peak. Unterhalb von ca. $\omega = 10^{-2}$ Hz zeigt sich auch die zweite Zeitkonstante, die Impedanz geht in Sättigung und die Phasenverschiebung sinkt gegen null.

5.1 Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS)

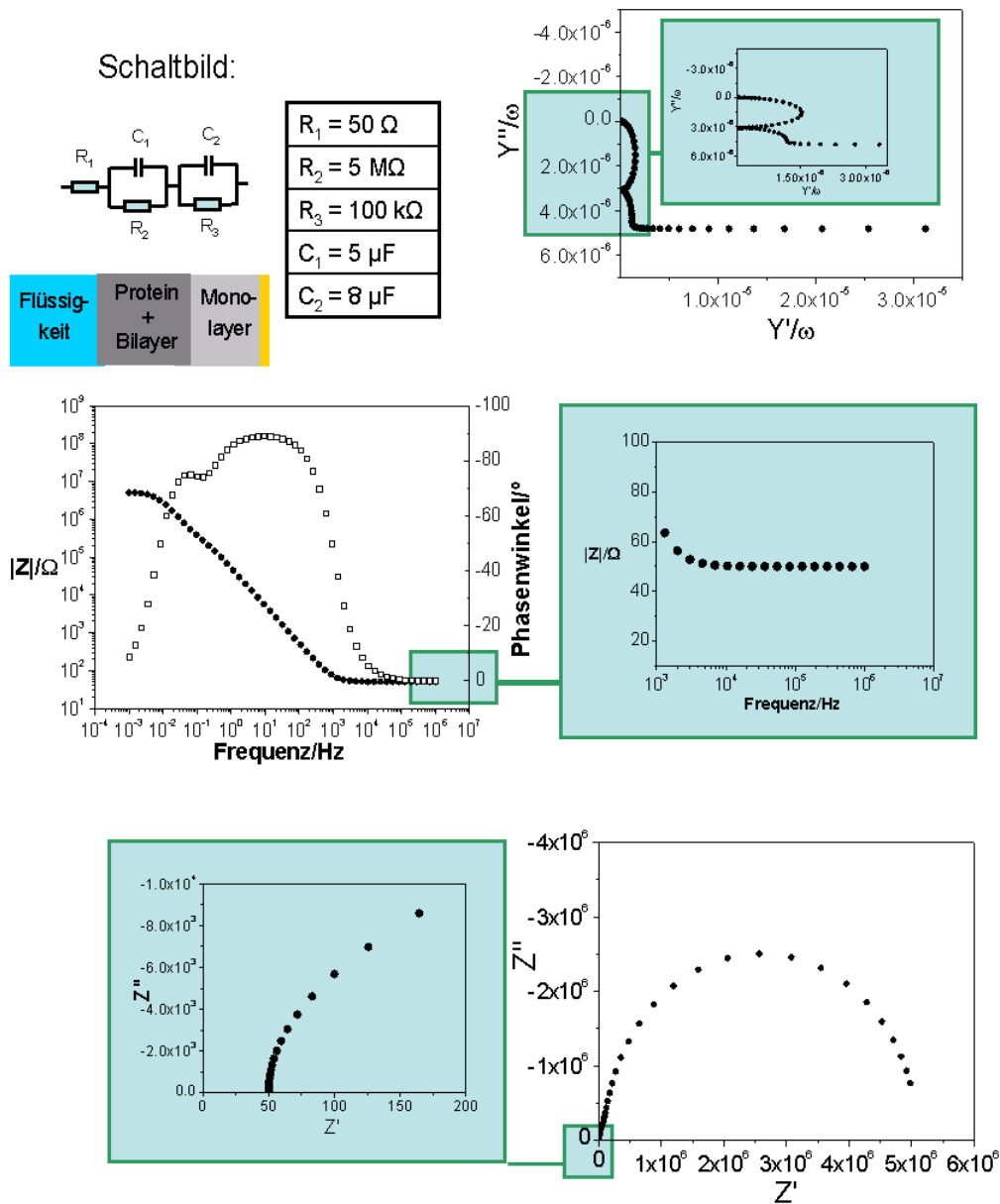


Abbildung 5.1.8: Impedanzspektren für zwei RC-Glieder mit vorgeschaltetem Ohmschen Widerstand. Dieser Ersatzschaltkreis repräsentiert z.B. eine Protein-verankerte Lipid-Membran, wobei ein RC-Glied die Protein-Schicht mit Membran, das andere RC-Glied die Ankerregion repräsentiert. Oben: frequenzreduzierter Admittanzplot, Mitte: Bode-Plot ($\Phi(\omega)$: offene Vierecke, $|Z|(\omega)$: gefüllte schwarze Kreise), unten: Nyquist-Plot. Die Beispielwerte für die Simulation sind in der Tabelle angegeben.

5.2 Cyclovoltammetrie

Die Cyclovoltammetrie bzw. zyklische Voltammetrie oder auch Dreieckspannungsmethode ist ein analytisches Verfahren, mit dem man rasch einen Überblick über verschiedene Elektrodenprozesse gewinnen kann. Aus Cyclovoltammogrammen lassen sich Informationen über die Thermodynamik von Redoxprozessen sowie Kenntnisse über die Kinetik von heterogenen Elektronentransferreaktionen sowie von gekoppelten chemischen Reaktionen erhalten. Die Cyclovoltammogramme haben oft charakteristische Formen sowie eindeutige Potentiallagen der Peaks, so dass die elektrochemischen Eigenschaften von Redoxsystemen gut aus den Kurven abgeleitet werden können.

Lange Zeit wurden Elektronentransferprozesse als rein thermodynamische Phänomene betrachtet, die elektrochemisch mit der Nernst-Gleichung beschrieben wurden [105]. Diese Ansicht änderte sich, als klar wurde, dass Elektronentransferprozesse eine endliche Geschwindigkeit aufweisen, deren Betrag von Aktivierungsparametern abhängt [106], und dass häufig chemische Reaktionen vor- und nachgelagert sind. Die Cyclovoltammetrie gibt Einblick in thermodynamische Parameter wie das Redoxpotenzial, aber auch in die Kinetik von Elektrodenreaktionen, die sowohl die heterogenen und homogenen Elektronentransferschritte als auch angekoppelte chemische Reaktionen umfassen. Die theoretischen Grundlagen der Methode wurden u.a. von Randles und Sevcik mathematisch exakt analysiert, so dass alle wichtigen Varianten elektrochemischer Prozesse in ihrer Beziehung zum voltammetrischen Signal quantitativ interpretiert werden können [107] [108].

5.2.1 Experimentelle Grundlagen

In einem cyclovoltammetrischen Experiment wird eine stationäre Arbeitselektrode verwendet, die in einen ruhenden Elektrolyten eintaucht. Der Arbeitselektrode wird ein sich zeitlich linear änderndes Potenzial $E(t)$ aufgeprägt, das nach Erreichen eines Umkehrpotenzials E_1 wiederum zeitlich linear bis zum zweiten Umkehrpotenzial E_2 und dann zum Ausgangswert zurückgeführt wird (s. Abbildung 5.2.1 (b)). Oft werden mehrere Scans hintereinander ausgeführt. Die angelegte Spannung zeigt in Abhängigkeit von der Zeit den in Abbildung 5.2.1 (a) dar-

5.2 Cyclovoltammetrie

gestellten Verlauf einer Dreiecksspannung. Die Scan-Geschwindigkeit (auch Scan Rate oder Spannungsvorschubgeschwindigkeit genannt) $v = \frac{dE}{dt}$ (V/S) kann beim heutigen Stand der Technik über 10'000 V/s erreichen. Praktisch werden jedoch meist Geschwindigkeiten von 5mV/s bis 1V/s realisiert. Der Spannungsbereich umfasst Spannungen im Bereich der zu untersuchenden Redoxpotenziale.

Ein typisches Cyclovoltammogramm ist in Abbildung 5.2.1 (b) dargestellt. Der Stromverlauf wird in Abhängigkeit von der angelegten Spannung aufgezeichnet. Die Technik ist mit der Drei-Elektroden-Konfiguration, die bei der elektrochemischen Impedanzspektroskopie zum Einsatz kommt (Abschnitt 5.1.2), ohne weiteren experimentellen Aufwand einsetzbar.

5.2.2 Cyclovoltammetrie gelöster Redox-Spezies

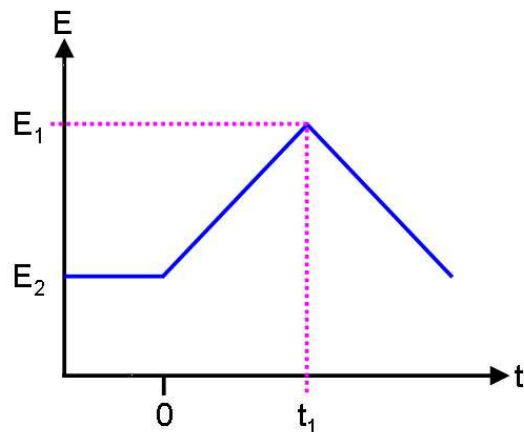
Man unterscheidet zwei verschiedene Arten von Strömen, die bei Elektrodenreaktionen eine Rolle spielen:

Nicht-Faradaysche Ströme Nicht-Faradaysche Ströme sind elektrostatischer Natur und nicht mit einer elektrochemischen Reaktion verbunden. Sie resultieren aus der Reorganisation von Ionen im Elektrolyten nahe der Elektrodengrenzfläche und werden auch kapazitive Ströme I_C genannt. Für einen Spannungsverlauf $E = E_{Anfang} + v_{Scan} \cdot t$ bei konstanter Grenzschieichtkapazität C und mit der Annahme, dass man nur einen einzigen Lösungsmittelwiderstand R_s vorliegen hat, erhält man für den Strom:

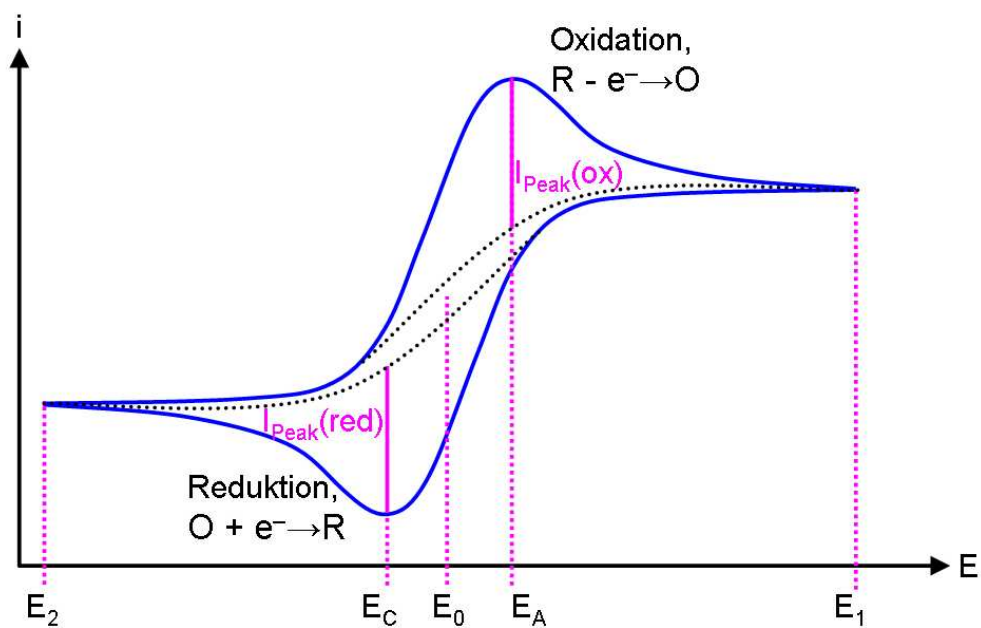
$$I_C = \frac{E_{Anfang}}{R_s} \cdot e^{-t \cdot C/R_s} + v \cdot C \cdot (1 - e^{-t \cdot C/R_s}) \quad (5.2.1)$$

Die Gleichung sagt aus, dass der kapazitive Strom mit zunehmender Scan Rate und mit zunehmender Grenzschieichtkapazität zunimmt. Beim Rücklauf des CV bekommt der zweite Summand ein negatives Vorzeichen, so dass sich Hin- und Rückrichtung des Cyclovoltammogramms nach Abklingen des transienten Anteils um $\Delta I = 2vC$ unterscheiden [104].

Faradaysche Ströme Faradaysche Ströme haben ihre Herkunft im heterogenen Ladungstransfer zwischen Elektrode und einer Redoxspezies im Elektrolyten,



(a)



(b)

Abbildung 5.2.1: (a) Das bei zyklischer Voltammetrie angelegte Potenzial hat eine Dreiecksform, da es in Abhängigkeit von der Zeit linear zwischen einem negativen und einem positiven Potenzial hin- und hergeführt wird. (b) Resultierendes Cyclovoltammogramm mit typischer Kurvenform für einen reversiblen Ladungstransfer (s.u.). E_A : anodisches Spitzenpotenzial, E_C : kathodisches Spitzenpotenzial, E_1 und E_2 : Umkehrpotenziale, E^0 : Redoxpotenzial

5.2 Cyclovoltammetrie

der immer mit einem chemischen Stoffumsatz verbunden ist. Den quantitativen Zusammenhang liefern die Faradayschen Gesetze [104].

Die einfache Faradaysche Elektrodenreaktion besteht im heterogenen Ladungstransfer von einer elektroaktiven Spezies A zur Elektrode oder umgekehrt. In Abhängigkeit vom Elektrodenpotenzial wird Spezies O zur Spezies R reduziert bzw. umgekehrt Spezies R oxidiert:



Zur Vereinfachung der theoretischen Analyse werden im Folgenden nur Reduktionsvorgänge betrachtet. Zwei Prozesse prägen hierbei das Erscheinungsbild der voltammetrischen Strom-Spannungskurven: der heterogene Ladungstransfer und der diffusionsbedingte Massentransport. Der heterogene Ladungstransfer an der Phasengrenzfläche Elektrode/Elektrolyt wird durch die Butler-Volmer-Gleichung beschrieben, die als Grundgleichung der elektrochemischen Kinetik gilt:

$$\begin{aligned} j_A(0, t) &= \frac{i}{nFA} \\ &= c_O(0, t) \cdot k^0 \cdot e^{-\alpha \frac{nF}{RT}(E - E_0)} - c_R(0, t) \cdot k^0 \cdot e^{(1-\alpha) \frac{nF}{RT}(E - E_0)} \end{aligned} \quad (5.2.3)$$

k^0 ist hierbei die Standardgeschwindigkeitskonstante des heterogenen Durchtritts, α ist der Durchtrittsfaktor, E_0 ist das Standardpotenzial, A ist die Elektrodenfläche, $c_O(0, t)$ und $c_R(0, t)$ sind die Oberflächenkonzentrationen der beteiligten Redoxpartner und F ist die Faraday-Konstante. Das Standardpotenzial E_0 charakterisiert einen Zustand, bei dem unter thermodynamischen Gleichgewichtsbedingungen die Oberflächenkonzentrationen der oxidierten und der reduzierten Form gleich groß sind. Die potenzialabhängigen Oberflächenkonzentrationen $c_O(0, t)$ und $c_R(0, t)$ führen aufgrund des Konzentrationsunterschieds zur übrigen Lösung zu einem diffusionskontrollierten Massentransport. Die Konzentrationsverteilung in der Diffusionsschicht, die mit der Zeit wächst, lässt sich aus dem zweiten Fickschen Gesetz berechnen:

$$\frac{\partial c_O}{\partial t} = D_O \frac{\partial^2 c_O}{\partial x^2} \quad (5.2.4)$$

$$\frac{\partial c_R}{\partial t} = D_R \frac{\partial^2 c_R}{\partial x^2} \quad (5.2.5)$$

Der Konzentrationsgradient an der Elektrodenoberfläche ist dem Ladungsfluss direkt proportional:

$$j_A(0, t) = -D_O \left(\frac{\partial c_O}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (5.2.6)$$

$$= D_R \left(\frac{\partial c_R}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (5.2.7)$$

Verschiedene charakteristische Strom-Spannungskurven Der an der Arbeitselektrode messbare Strom setzt sich demnach aus einem Anteil für den heterogenen Ladungstransfer (Gleichung 5.2.3) und einem Anteil für den Massentransport (Gleichung 5.2.6) zusammen. Man nennt dies den **Quasireversiblen Fall** des Ladungstransfers.

Ist die Geschwindigkeit des heterogenen Ladungstransfers so groß, dass sich an der Phasengrenze ein dynamisches Gleichgewicht einstellt, so spricht man vom **Reversiblen Fall**. Es gilt: $k^0 > 10^{-1} \frac{cm}{s}$. In diesem Fall vereinfacht sich die Butler-Volmer-Gleichung zur Nernst-Gleichung (Gleichung 5.2.8), d.h. die Oberflächenkonzentrationen $c_O(0,t)$ und $c_R(0,t)$ hängen nur noch vom Elektrodenpotential ab und werden nicht mehr durch heterogene kinetische Effekte beeinflusst.

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \cdot \ln \left(\frac{c_O}{c_R} \right) \quad (5.2.8)$$

Der Strom als Messgröße für den Ladungsfluss an der Elektrodenoberfläche wird ausschließlich durch den Massentransport als langsamstem Schritt kontrolliert (Diffusionskontrolle). Das Cyclovoltammogramm in Abbildung 5.2.1 zeigt einen reversiblen Redoxprozess. Die Form des Cyclovoltammogramms lässt sich wie folgt erklären:

5.2 Cyclovoltammetrie

Mit zunehmendem Potenzial $E(t)$ nimmt die Oberflächenkonzentration des Edukts R ab und die von O zu, wodurch der Gradient und damit auch der Ladungsfluss anwächst, bis nach Überschreiten des E_0 -Potenzials die Oberflächenkonzentration von R verschwindend klein wird, da jedes herandiffundierende Molekül sofort umgesetzt wird. Der Strom erreicht ein Maximum (bei E_A). Die sich weiter ausdehnende Diffusionsschicht bedingt nun, dass der Konzentrationsgradient an der Elektrodenoberfläche nahezu unabhängig vom Potenzial abnimmt. Der Strom wird kleiner, denn in diesem Bereich gilt die Cottrell-Gleichung:

$$i(t) = \frac{nFA \cdot \sqrt{D} \cdot C_0^*}{\sqrt{\pi \cdot t}} \quad (5.2.9)$$

C_0^* ist die Anfangskonzentration des Substrats und D dessen Diffusionskonstante. Analoge Phänomene ergeben sich bei abnehmendem Potenzial. Die umgekehrte Flussrichtung, die aus der potenzialabhängigen Umwandlung von O nach R resultiert, führt zu einem entsprechenden negativen Strom, der einen Minimalwert erreicht und mit zunehmender Verarmung an O in der Diffusionsschicht langsam gegen Null abfällt.

Ein ideal reversibler Vorgang hat einige besondere Charakteristika, die hier aufgeführt werden sollen: Da der Prozess reversibel ist, sind die Lage des reduktiven und des oxidativen Peaks unabhängig von der Scan Rate. Der Abstand der Spitzenpotenziale eines Redoxzentrums beträgt

$$\Delta E = |E_A - E_C| = \frac{59}{n} mV, \quad (5.2.10)$$

wobei n die Anzahl der Elektronen ist, die während eines Redoxprozesses umgesetzt werden. Die Halbwertsbreite der Peaks beträgt bei 25°C- unabhängig von der Scan Rate- 28mV dividiert durch die Anzahl der umgesetzten Elektronen. Der maximale Strom in der Peakmitte nimmt sowohl im reduktiven wie auch im oxidativen Fall mit der Wurzel der Scan Rate zu. Er ist durch die Randles-Sevcik-Gleichung gegeben:

$$i \approx 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot C \cdot \sqrt{D \cdot v} \quad (5.2.11)$$

Die Peakfläche eines Redox-Peaks ist proportional zur übertragenen Ladung, wobei zwischen der Ladung Q und der Scan Rate v folgender Zusammenhang gilt:

$$Q = \frac{E \cdot i}{v} \quad (5.2.12)$$

Im **Irreversiblen Fall** ist der Ladungstransfer an der Elektrode extrem langsam, es gilt: $k^0 < 10^{-5} \frac{\text{cm}}{\text{s}}$. Abhängig vom Potenzial hat nur die anodische oder die kathodische Durchtrittsreaktion eine messbare Geschwindigkeitskonstante. Der Strom wird demnach weitgehend durch die Geschwindigkeit der Ladungstransferreaktion kontrolliert. Die Nernst-Gleichung ist unter solchen Voraussetzungen nicht mehr anwendbar. Dies bedeutet weiterhin, dass die gemessenen Potenziale nicht mit thermodynamischen Gleichgewichtspotenzialen verglichen werden können.

5.2.3 Cyclovoltammetrie an Schichten oberflächengebundener Redoxspezies

In den bisherigen Betrachtungen befanden sich die Reaktanden und Produkte frei in Lösung. Bei Molekülen, die an eine Oberfläche gebunden sind, spielt Diffusion keine Rolle, weswegen nur noch der Ladungstransfer betrachtet werden muss. Es gibt keine Einschränkungen durch Diffusions-limitierten Massentransport zur Elektrode. Abbildung 5.2.2 zeigt ein Cyclovoltammogramm einer Redox-Spezies, die auf einer Oberfläche immobilisiert ist. Ein Hauptunterschied zwischen Cyclovoltammogrammen von gelösten und oberflächenfixierten Redox-Spezies ist der, dass die Peaks für letzteren Fall scharf und Gauß-förmig sind, was auf den fehlenden Massentransport zurückzuführen ist. Die beim anodischen und beim kathodischen Prozess übertragene Ladung ist gleich groß, denn die Oberflächenbelegung ändert sich nicht. Der Strom steigt von Null auf den Maximalwert des Redox-Peaks und fällt dann wieder auf Null zurück. Im Idealfall gibt es keine Peak-Separation, es gilt also $\Delta E=0$.

Wenn das oberflächenfixierte Redox-Paar durch eine dielektrische Schicht getrennt ist, dann kann die Kapazität dieser Schicht einen kapazitiven Strom zur Folge haben. Die Redox-Peaks haben dann einen zusätzlichen Offset. Im Fall eines ideal reversiblen Redox-Vorgangs Oberflächen-gebundener Redox-Spezies ist die Peak-Separation Null und der Peakstrom ist gegeben durch [104]:

$$i = \frac{n^2 F^2 A \cdot v \cdot \Gamma_{tot}}{4RT} \quad (5.2.13)$$

Dabei ist Γ_{tot} die Oberflächenbelegung der Redox-Moleküle. Die Gleichung sagt

5.2 Cyclovoltammetrie

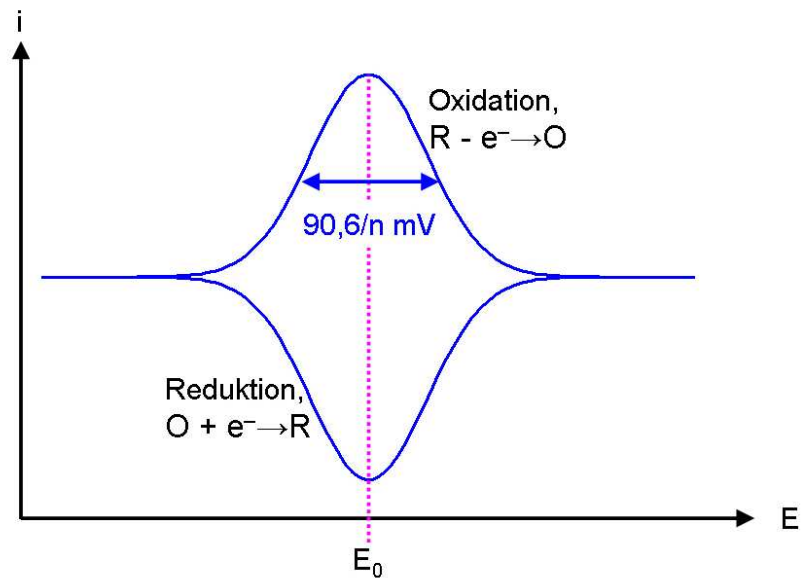


Abbildung 5.2.2: Cyclovoltammogramm einer Oberflächen-fixierten Redox-Spezies. Die Peaks sind Gauß-förmig und symmetrisch, die Halbwertsbreite beträgt $90,6\text{mV}$ dividiert durch n .

aus, dass der Strom und damit die Anzahl der Reaktionen durch die Anzahl der Redox-aktiven Moleküle auf der Oberfläche gegeben ist. Weiterhin ist der Peakstrom proportional zur Scan Rate v , im Gegensatz zur Abhängigkeit $\propto \sqrt{v}$ bei einer diffusionskontrollierten reversiblen Umsetzung von gelösten Redoxmolekülen (s. Gleichung 5.2.11, Randles-Sevcik-Gleichung).

Die Halbwertsbreite eines Redox-Peaks beträgt bei 25°C

$$\Delta E = 3,53 \frac{RT}{nF} = 90,6\text{mV}/n \quad (5.2.14)$$

Kapitel 6

Weitere Messmethoden

In diesem Abschnitt werden weitere experimentelle Methoden theoretisch behandelt, die im Rahmen dieser Dissertation zum Einsatz kamen. Dies sind die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR, Surface Plasmon Resonance) zur Bestimmung von Schichtdicken sowie die Rasterkraftmikroskopie (AFM, Atomic Force Microscopy)

6.1 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR)

Die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (Surface Plasmon Resonance, SPR) dient der Bestimmung von Schichtdicken, die mit dieser Methode relativ unkompliziert möglich ist.

Oberflächenplasmonen lassen sich schon durch die Maxwell-Gleichungen erklären, beschrieben wurden sie jedoch erst 1957 durch Ritchie [109]. Die ersten SPR-Messungen wurden 1959 von Turbadar veröffentlicht [110]. 1968 wurde erstmals von Otto und in einer anderen Messanordnung von Kretschmann und Raether die Oberflächenplasmonenresonanz zur Bestimmung des Brechungsindex verwendet [111] [112].

6.1.1 Elektromagnetische Beschreibung von Oberflächenplasmonen

An der Grenzfläche zwischen einem Metall und einem Dielektrikum kann es zu kollektiven Oszillationen des quasi-freien Elektronengases im Metall kommen, welche an elektromagnetische Wellen gekoppelt sind. Diese so genannten Oberflächenplasmonen oder auch plasmonische Oberflächenpolaritonen propagieren entlang der Grenzfläche. Sie werden durch Dissipation ihrer Energie in das Metall stark gedämpft. Diese Dämpfung geschieht in Ausbreitungsrichtung der Oberflächenplasmonen, wobei fast die gesamte Energie in Wärme umgewandelt wird [113] [114].

Zur Herleitung der orts- und zeitabhängigen Feldverteilung der Oberflächenplasmonen benötigt man die makroskopischen Maxwell-Gleichungen in Materie [115]:

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{\mathbf{D}} = 4\pi \rho_{ext} \quad (6.1.1)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{\mathbf{E}} + \frac{1}{c} \frac{\partial \vec{\mathbf{B}}}{\partial t} = 0 \quad (6.1.2)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{\mathbf{B}} = 0 \quad (6.1.3)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{\mathbf{H}} - \frac{1}{c} \frac{\partial \vec{\mathbf{D}}}{\partial t} = \frac{4\pi}{c} \vec{\mathbf{J}}_{ext} \quad (6.1.4)$$

Betrachtet man ein homogenes isotropes Medium, bei dem sowohl die Ladungs- als auch die Stromdichte Null sind, so gilt:

$$\vec{\mathbf{D}} = \epsilon \vec{\mathbf{E}} \quad \vec{\mathbf{H}} = \frac{\vec{\mathbf{B}}}{\mu} \quad \vec{\mathbf{J}}_{ext} = 0 \quad \rho_{ext} = 0$$

Damit vereinfachen sich die Maxwell-Gleichungen zu

6.1 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR)

$$\vec{\nabla} \vec{\mathbf{E}} = 0 \quad (6.1.5)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{\mathbf{E}} + \frac{\mu}{c} \frac{\partial \vec{\mathbf{H}}}{\partial t} = 0 \quad (6.1.6)$$

$$\vec{\nabla} \vec{\mathbf{H}} = 0 \quad (6.1.7)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{\mathbf{H}} - \frac{\epsilon}{c} \frac{\partial \vec{\mathbf{E}}}{\partial t} = 0 \quad (6.1.8)$$

Hierbei sind $\epsilon = \epsilon(\omega)$ und $\mu = \mu(\omega)$ die makroskopischen Responsefunktionen. Die meisten Materialien haben eine Permeabilität von $\mu \approx 1$ [115]. Unter Annahme von Laserlicht, welches in guter Näherung monochromatisch ist, wird hier dispersionsfrei gerechnet. Die folgenden Rechnungen werden am magnetischen Feld durchgeführt. Berechnungen für das elektrische Feld ergeben sich äquivalent.

Anwenden des Nabla-Operators in Form von $\vec{\nabla} \times$ auf Gleichung 6.1.8 und Umformen liefert unter Ausnutzung der Relation $\vec{\nabla} \times \vec{\nabla} \times \vec{\mathbf{H}} = -\Delta \vec{\mathbf{H}}$ mit $\mu=1$:

$$\Delta \vec{\mathbf{H}} = -\frac{\epsilon}{c} \frac{\partial}{\partial t} (\vec{\nabla} \times \vec{\mathbf{E}})$$

Einsetzen des Ausdrucks für $\vec{\nabla} \times \vec{\mathbf{E}}$ aus Gleichung 6.1.6 ergibt:

$$\Delta \vec{\mathbf{H}} = \epsilon \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{\mathbf{H}}}{\partial t^2} \quad (6.1.9)$$

Dies ist die Wellengleichung und es wird eine Lösung für den monochromatischen Fall gesucht. Für die Lösung dieses Problems wählt man den folgenden Ansatz:

$$\vec{\mathbf{H}}(\vec{\mathbf{r}}, t) = \vec{\mathbf{H}}(\vec{\mathbf{r}}) \cdot e^{-i\omega t} \quad (6.1.10)$$

Setzt man Gleichung 6.1.10 in 6.1.9 ein, so erhält man die zeitunabhängige Helmholtzgleichung:

$$\left(\Delta + \frac{\omega^2}{c^2} \right) \cdot \vec{\mathbf{H}}(\vec{\mathbf{r}}) = 0 \quad (6.1.11)$$

Die Lösung für diese Gleichung liefert der Ansatz

$$\vec{\mathbf{H}}(\vec{\mathbf{r}}) = \vec{\mathbf{H}}_0 \cdot e^{i\vec{\mathbf{k}}\vec{\mathbf{r}}} \quad (6.1.12)$$

mit beliebiger Amplitude $\vec{\mathbf{H}}_0$. Einsetzen dieser Lösung in 6.1.11, Ausführen des Laplace-Operators und Kürzen liefert folgende Bedingung:

$$\begin{aligned} -\vec{\mathbf{k}}^2 + \frac{\omega^2 \epsilon}{c^2} &= 0 \\ \Rightarrow \omega^2 &= \frac{c^2 \vec{\mathbf{k}}^2}{\epsilon} \\ &= \frac{c^2 \vec{\mathbf{k}}^2}{n^2} \end{aligned}$$

Der hier eingeführte Brechungsindex n ist im Allgemeinen komplex:

$$n = \sqrt{\epsilon} = n_r + i\kappa$$

Die Lösung von Gleichung 6.1.11 stellt eine elliptisch polarisierte Welle dar. Wählt man einen festen Wellenvektor $\vec{\mathbf{k}}_0$ (reell, beliebige Richtung) und eine reelle Amplitude $\vec{\mathbf{H}}_0$, so erhält man den Spezialfall einer linear polarisierten Welle.

Oberflächenplasmonen sind Lösungen an einer Grenzfläche, bei denen das elektromagnetische Feld an die Grenzfläche gebunden ist und an ihr entlang propagiert. Aus den makroskopischen Maxwellgleichungen kann man die Stetigkeitsbedingungen für die Felder an der Grenzfläche des Problems bestimmen und erhält die Bedingung, dass die Vektorkomponenten von $\vec{\mathbf{E}}$, $\vec{\mathbf{H}}$ und $\vec{\mathbf{k}}$ parallel zur Grenzfläche kontinuierlich von einem Medium ins andere übergehen müssen.

Trifft eine linear polarisierte Welle auf eine Grenzfläche, so müssen die Kontinuitätsbedingungen erfüllt werden. Die linear polarisierte Welle kann in eine parallel (p-) und eine senkrecht (s-) polarisierte Welle zerlegt werden, wobei sich die Bezeichnungen des Polarisationszustandes auf die Einfallsebene beziehen (bei s-polarisiertem Licht gilt somit $\vec{\mathbf{E}} \parallel$ Grenzfläche, s. auch Abschnitt 4.3). Die Kontinuitätsbedingungen können für s- und p-Polarisation getrennt betrachtet werden. Jede andere Polarisation ergibt sich als lineare Superposition.

Im Folgenden wird eine Grenzfläche zwischen einem Dielektrikum (1) und einem Metall (2) mit den Dielektrizitätskonstanten ϵ_d und ϵ_m betrachtet (s. Abbildung

6.1 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR)

6.1.1). Die Grenzfläche wird durch die y-z-Ebene repräsentiert.

Man kann zeigen, dass man mit s-polarisiertem Licht kein Oberflächenplasmon anregen kann [113]. Aus diesem Grund kann man folgende Einschränkung für die eintreffende Welle machen:

$$k_{y1} = k_{y2} = k_y = 0$$

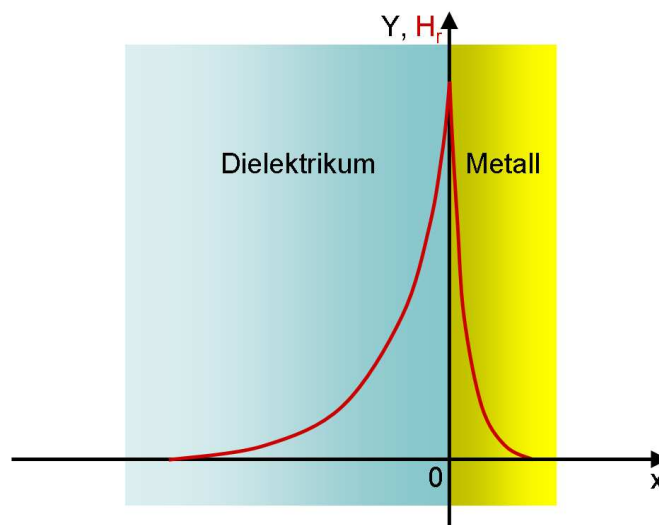


Abbildung 6.1.1: Verteilung des magnetischen Feldes eines Oberflächenplasmons senkrecht zur Grenzfläche

Für p-Polarisation gilt:

$$\vec{\mathbf{E}}(\vec{\mathbf{r}}, t) = \begin{pmatrix} E_x \\ 0 \\ E_z \end{pmatrix} \quad \vec{\mathbf{H}}(\vec{\mathbf{r}}, t) = \begin{pmatrix} 0 \\ H_y \\ 0 \end{pmatrix}$$

Gleichung 6.1.12 lautet für die beiden Bereiche $x < 0$ und $x > 0$ mit ausgeschriebenen Raumkomponenten, wobei der Index d für das Dielektrikum und der Index m für das Metall steht:

$$\vec{\mathbf{H}}_d(x, z) = \vec{\mathbf{H}}_{0d} \cdot e^{ik_{x_d} \cdot x + ik_{z_d} \cdot z} \quad x < 0 \quad (6.1.13)$$

$$\vec{\mathbf{H}}_m(x, z) = \vec{\mathbf{H}}_{0m} \cdot e^{ik_{x_m} \cdot x + ik_{z_m} \cdot z} \quad x > 0 \quad (6.1.14)$$

Einsetzen von 6.1.13 in 6.1.11 und Ausführen des Laplace-Operators liefert in beiden Fällen:

$$k_x^2 + k_z^2 = \frac{\omega^2}{c^2} \epsilon$$

und

$$k_x = \sqrt{\frac{\omega^2}{c^2} \epsilon - k_z^2} \quad (6.1.15)$$

Damit erhält man die folgende Feldverteilung in Abhängigkeit von x:

$$\vec{\mathbf{H}}_d(x) = \vec{\mathbf{H}}_{0d} \cdot e^{ik_{x_d} \cdot x} \quad \text{mit} \quad k_{x_d} = \sqrt{\frac{\omega^2}{c^2} \epsilon_d - k_{z_d}^2} \quad , x < 0 \quad (6.1.16)$$

$$\vec{\mathbf{H}}_m(x) = \vec{\mathbf{H}}_{0m} \cdot e^{-ik_{x_m} \cdot x} \quad \text{mit} \quad k_{x_m} = \sqrt{\frac{\omega^2}{c^2} \epsilon_m - k_{z_m}^2} \quad , x < 0 \quad (6.1.17)$$

Im nächsten Schritt wird die Komponente E_z für beide Medien berechnet. Ausgehend von der Maxwellschen Gleichung 6.1.8 erhält man nach Umformung und mit Hilfe von Gleichung 6.1.12

$$\begin{aligned} \vec{\nabla} \times \vec{\mathbf{H}} - \frac{\epsilon}{c} \frac{\partial \vec{\mathbf{E}}}{\partial t} &= 0 \\ \Rightarrow \frac{\partial}{\partial x} H_y &= \frac{1}{c} \epsilon \frac{\partial}{\partial t} E_z \\ &= i\omega \frac{1}{c} \epsilon E_z \\ \Rightarrow E_z &= -\frac{ic}{\epsilon\omega} \frac{\partial}{\partial x} H_y \end{aligned}$$

6.1 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR)

Nähert man sich der Stelle $x=0$ von der Seite des Dielektrikums her, so erhält man unter Benutzung von Gleichung 6.1.13 für H_y folgende Ausdrücke für E_z :

$$E_{z_d} = -\frac{ic}{\epsilon_d \omega} i k_{x_d} H_{y_d}$$

$$E_{z_m} = -\frac{ic}{\epsilon_m \omega} i k_{x_m} H_{y_m}$$

Durch die Kontinuitätsbedingung an der Stelle $x=0$

$$E_{z_d} = E_{z_m} \quad H_{y_d} = H_{y_m}$$

erhält man als Existenzbedingung für Oberflächenplasmonen:

$$\frac{k_{x_d}}{k_{x_m}} = -\frac{\epsilon_d}{\epsilon_m} \quad (6.1.18)$$

Diese Gleichung kann nur erfüllt werden, wenn die dielektrischen Konstanten ϵ_d und ϵ_m unterschiedliche Vorzeichen haben. Diese Bedingung ist an Grenzflächen zwischen einem Dielektrikum und einem Metall im optischen Frequenzbereich erfüllt [113].

Setzt man k_{x_d} und k_{x_m} aus den Gleichungen 6.1.16 und 6.1.17 ein, so erhält man unter Verwendung der Kontinuitätsbedingung $k_{z_d} = k_{z_m} = k_z$:

$$k_z = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_d \cdot \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \quad (6.1.19)$$

An dieser Stelle sei nochmals darauf hingewiesen, dass es sich bei ϵ_d und ϵ_m um frequenzabhängige Funktionen handelt. Aus Gleichung 6.1.10 folgt unter Verwendung von 6.1.13 die orts- und zeitabhängige Feldverteilung des magnetischen Feldes in beiden Medien:

$$\vec{\mathbf{H}}_d(x, z, t) = \vec{\mathbf{H}}_{0d} \cdot e^{i(k_{x_d} \cdot x + k_z \cdot z - \omega t)} \quad (6.1.20)$$

$$\vec{\mathbf{H}}_m(x, z, t) = \vec{\mathbf{H}}_{0m} \cdot e^{i(-k_{x_m} \cdot x + k_z \cdot z - \omega t)} \quad (6.1.21)$$

mit

$$k_{x_1} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_d^2}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \quad (6.1.22)$$

$$k_{x_2} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m^2}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \quad (6.1.23)$$

$$k_z = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_d \cdot \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \quad (6.1.24)$$

Die Frequenz ω ist eine reelle Zahl. $\epsilon_2 = \epsilon_{Metall} = \epsilon_m$ ist komplex, daher ist k_z ebenfalls komplex, d.h. $k_z = k'_z + ik''_z$. Als Konsequenz hieraus haben Oberflächenplasmonen, die entlang der Metall/Dielektrikum-Grenzfläche propagieren, eine endliche Reichweite $L_z = \frac{1}{k''_z}$.

Auch die Eindringtiefe senkrecht zur Grenzfläche, nach denen das Feld in den beiden Medien auf $\frac{1}{e}$ abgefallen ist, berechnen sich als Kehrwert des jeweiligen k , in diesem Fall k_x . Betrachtet man z.B. die magnetische Feldverteilung an einer Luft-Gold-Grenzfläche ($\epsilon_{Au} = -12,1 + i \cdot 1,3$), an der ein Oberflächenplasmon angeregt wird, so erhält man abhängig von der Laserwellenlänge Eindringtiefen von ca. 100 nm bis 500 nm [113] [116]. Eine schematische Darstellung der Dämpfung des Plasmons in z-Richtung und der Eindringtiefe in x-Richtung ist in Abbildung 6.1.2 gegeben.

6.1.2 Anregung von Oberflächenplasmonen

Eine Anregung von Oberflächenplasmonen durch ein einfallendes Photon ist nur möglich, wenn die Impulserhaltung erfüllt ist. Im vorliegenden Fall muss die Wellenvektorkomponente des Photons in Ausbreitungsrichtung $k_{Ph,z}$ identisch mit der Wellenzahl des Plasmons k_z sein. Der Wellenvektor des Plasmons in Ausbreitungsrichtung ist durch Gleichung 6.1.24 gegeben:

$$k_z = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_d \cdot \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \quad (6.1.25)$$

Der Wellenvektor des Photons ist gegeben durch [115]

6.1 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR)

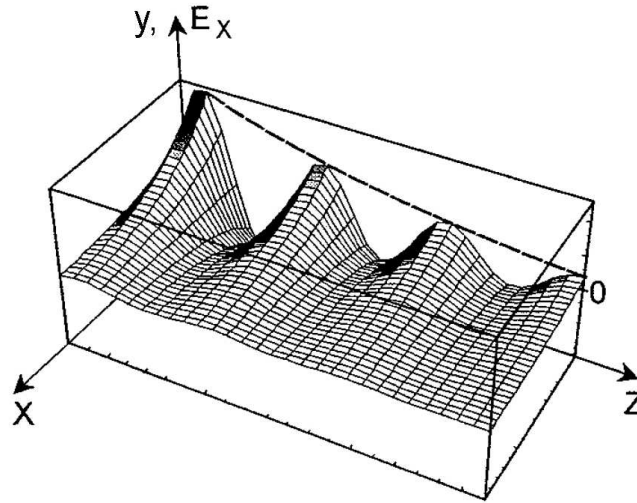


Abbildung 6.1.2: Evaneszenter Charakter eines Oberflächenplasmons, das an einer Metall/Dielektrikum-Grenzfläche (y-z-Grenzfläche) angeregt wurde und in z-Richtung propagiert. Die Komponente des elektrischen Feldes in x-Richtung, senkrecht zur Oberfläche, fällt exponentiell ab. Bild: [113]

$$k_{Ph} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_d} \quad (6.1.26)$$

Gegenüberstellen der Gleichungen 6.1.25 und 6.1.26 liefert folgende Relation:

$$\sqrt{\frac{\epsilon_d \cdot \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \geq \sqrt{\epsilon_d} \quad (6.1.27)$$

Diese Gleichung hat die unmittelbare Konsequenz, dass der Impuls eines frei propagierenden Photons in einem dielektrischen Medium immer kleiner ist als der Impuls eines Oberflächenplasmons, welches entlang der Grenzfläche dieses Mediums und einem Metall propagiert. Für die Anregung von Oberflächenplasmonen spielt nur die z-Komponente des einfallenden Photons eine Rolle, da diese parallel zu \vec{k}_{sp} ist (der Index sp steht für „surface plasmon“). Die relevante Komponente ist also

$$k_{ph,z} = |\vec{k}_{ph}| \cdot \sin \theta \quad (6.1.28)$$

(s. auch Abbildung 6.1.3 (a)). Die Dispersionsrelationen für Oberflächenplasmo-

nen und für freie Photonen im Dielektrikum sind in Abbildung 6.1.3 (b) veranschaulicht. Der Betrag von $k_{ph,z}$ kann durch Variation des Winkels θ Werte zwischen null (senkrechter Einfall, Punkt 0 in Abbildung 6.1.3 (b)) und k_{ph} (streifender Einfall, Punkt A) annehmen. Es ist aber nicht möglich, einen Impuls zu erreichen, der gleich dem Impuls des Oberflächenplasmons ist. Für niedrige Energien nähert sich die Dispersionskurve des Plasmons (rote Kurve in Abbildung 6.1.3) der Dispersionskurve des einfallenden Lichtes an (durchgezogene blaue Kurve), für hohe Energien entfernt sie sich aber immer weiter von der linearen Dispersionskurve des einfallenden Photons und nähert sich asymptotisch der Cutoff-Frequenz ω_{max} an, die durch die Plasmalfrequenz ω_{pl} des Metalls bestimmt wird:

$$\omega_{max} = \frac{\omega_{pl}}{1 + \epsilon_d} \quad (6.1.29)$$

Um eine Kopplung des einfallenden Photons an das Oberflächenplasmon zu erreichen, muss die Impulskomponente des einfallendes Photons in Ausbreitungsrichtung $k_{ph,z}$ erhöht werden. Hierzu kann man die Methode der Prismenkopplung verwenden, bei der das Licht aus einem höherbrechenden Medium (Prisma) mit einer Dielektrizitätskonstanten $\epsilon_p > \epsilon_d$ auf die Grenzfläche gestrahlt wird. Damit kann die Impulserhaltung für genau einen Winkel erfüllt werden (Punkt C in Abbildung 6.1.3) und es gilt:

$$\begin{aligned} k_{ph} = k_z \quad \text{mit} \quad k_{ph} &= \frac{\omega}{c} \cdot \sqrt{\epsilon_p} \sin \theta \\ \text{und} \quad k_z &= \frac{\omega}{c} \cdot \sqrt{\frac{\epsilon_d \cdot \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \\ \Rightarrow \sin \theta &= \frac{1}{\sqrt{\epsilon_p}} \cdot \sqrt{\frac{\epsilon_d \cdot \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \end{aligned} \quad (6.1.30)$$

Diese Gleichung lässt sich bei Kenntnis der Dispersionsverläufe des Prismas, des Metalls und des Dielektrikums numerisch lösen.

Eine der meist verwendeten Methoden für Prismenkopplung stellt die Kretschmann-Konfiguration dar (s. Abbildung 6.1.4) ¹. P-polarisiertes Licht wird aus dem hö-

¹Eine ebenfalls geläufige Methode ist die Otto-Konfiguration.

6.1 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR)

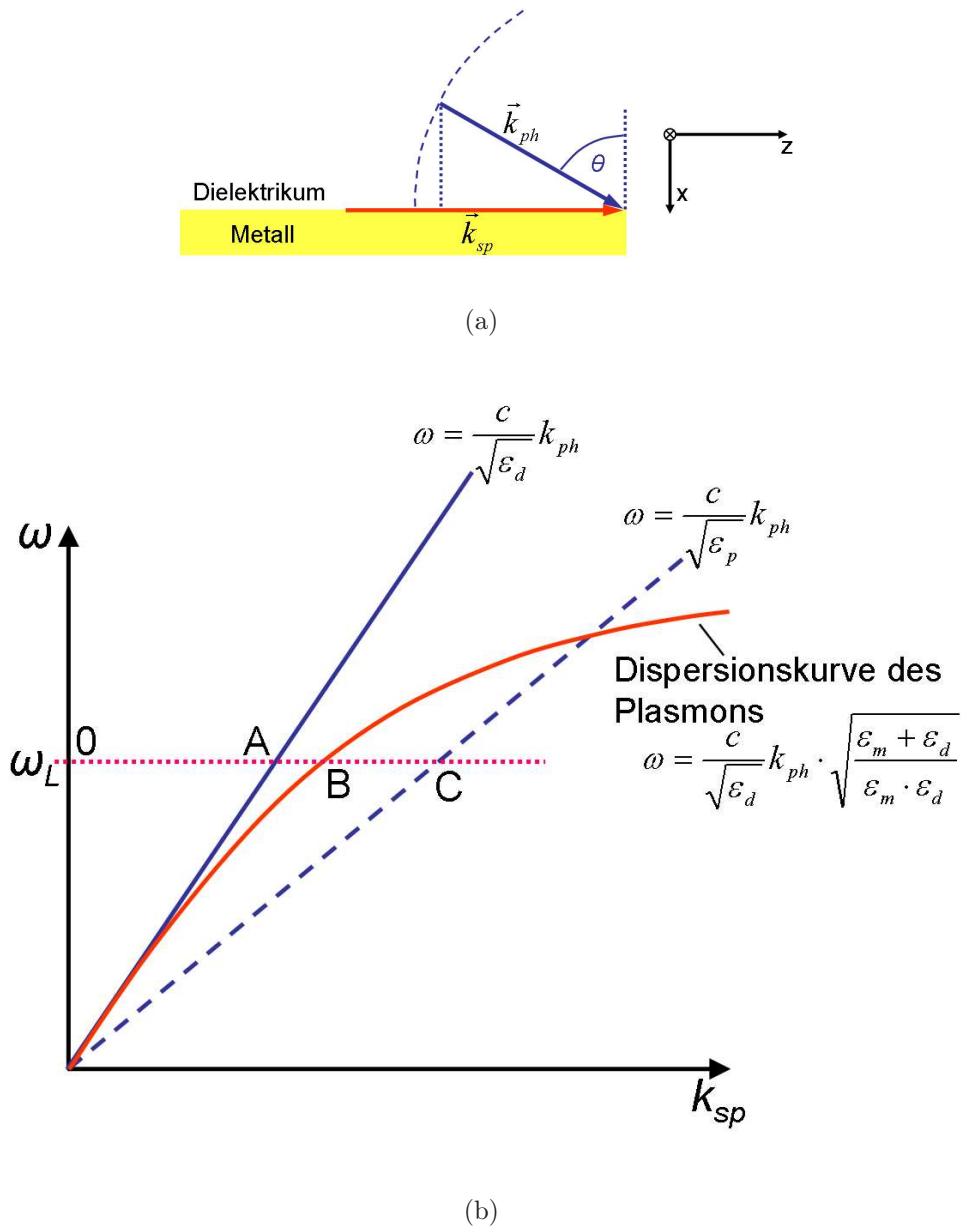


Abbildung 6.1.3: (a) Beziehung zwischen dem Impuls eines Oberflächenplasmons \vec{k}_{sp} , welches in z-Richtung propagiert, und dem Impuls eines einfallenden Photons \vec{k}_{ph} , das unter dem Winkel θ auf die Grenzfläche Dielektrikum/Metall auftrifft. Für jeden Winkel θ gilt: $|\vec{k}_{ph}| < |\vec{k}_{sp}|$; (b) Dispersionsrelation eines Photons im dielektrischen Medium (blau, durchgezogen) und im Prisma (blau, gestrichelt) sowie Dispersionsrelation des Oberflächenplasmons (rot); Details sind im Text erläutert [113].

herbrechenden Medium auf eine ca. 50 nm dicke Metallschicht eingestrahlt. Das durch die Metallschicht tretende evaneszente Feld kann unter geeignetem Einfallswinkel an der gegenüberliegenden Grenzfläche ein Oberflächenplasmon anregen.

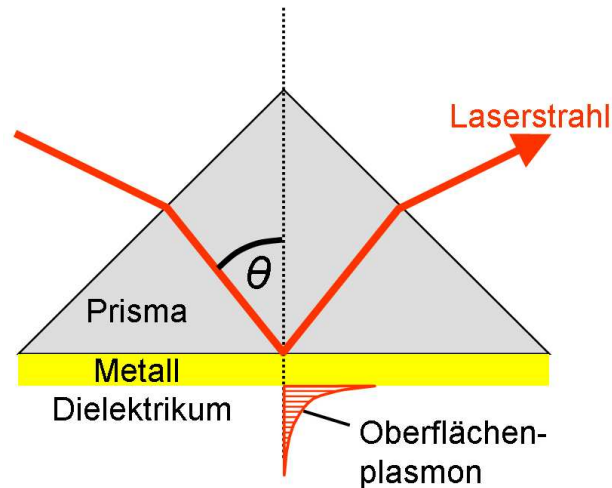


Abbildung 6.1.4: Oberflächenplasmonen-Anregung in der Kretschmann-Konfiguration. Ein dünner Metallfilm ($d \approx 50$ nm) wird auf die Basisfläche des Prismas aufgedampft und wirkt als Resonator für das Feld des einfallenden Photons unter dem Einfallswinkel θ

6.1.3 Schichtdickenbestimmung mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie

Die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie ist ein optisches Messverfahren und erlaubt u.a. die Detektion ultradünner dielektrischer Schichten von wenigen Nanometern [113]. Sie beruht auf dem Prinzip, dass Oberflächenplasmonen für eine gegebene Frequenz nur unter einem bestimmten Einfallswinkel angeregt werden können. In der Regel wird die winkelabhängige Intensität eines von der Metall-Dielektrikum-Grenzfläche reflektierten, p-polarisierten Laserstrahls verwendet. Der Anregungswinkel des Oberflächenplasmons wird durch die Dissipation der Energie in die Metallschicht als Intensitätsminimum erkennbar (s. Abbildung 6.1.5 rechts).

6.1 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR)

Brechungsindexänderungen im Bereich des evaneszenten Feldes eines Oberflächenplasmons lassen sich als Verschiebung des Anregungswinkels detektieren [112]. Wird eine dünne dielektrische Schicht auf das Metall aufgebracht, so ändert sich die Dispersionsrelation erneut- sofern der Brechungsindex der neuen Schicht von dem des umgebenden Dielektrikums (z.B. die Pufferlösung) abweicht. Die Änderung des Anregungswinkels ist nämlich proportional zur Dicke der assemblierten Schicht und zur Differenz der Brechungsindizes der assemblierten Schicht und des umgebenden Dielektrikums:

$$\Delta\theta = \theta_1 - \theta_2 \propto (n_{\text{Schicht}} - n_{\text{Dielektrikum}}) \cdot d \quad (6.1.31)$$

Dieser Zusammenhang ist auch in Abbildung 6.1.5 links dargestellt, rechts ist die Verschiebung des Resonanzwinkels als Folge der Assemblierung der Schicht veranschaulicht.

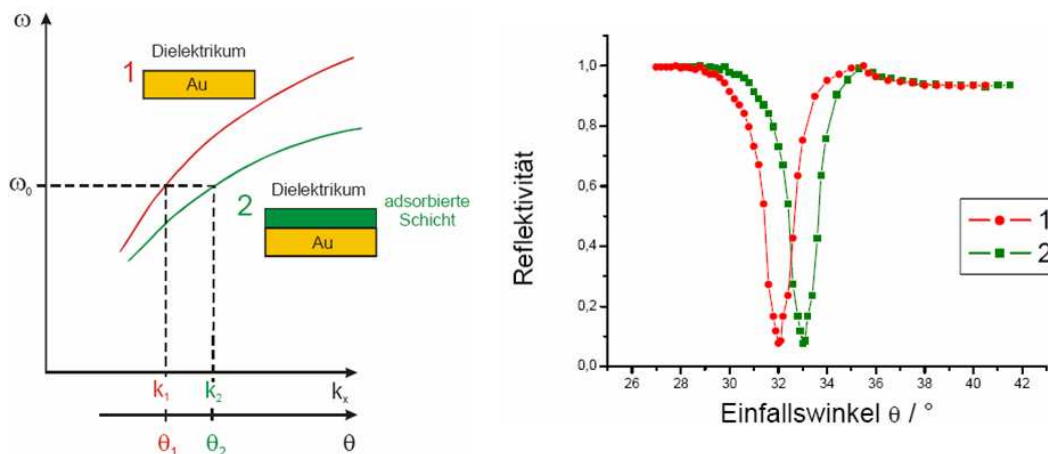


Abbildung 6.1.5: Rechts: Änderung der Dispersionsrelation des Oberflächenplasmons durch Anlagern einer dielektrischen Schicht mit einem Brechungsindex, der sich vom Brechungsindex des benachbarten Dielektrikums unterscheidet. Links: resultierende Verschiebung des Anregungswinkels für ein Oberflächenplasmon.

Bei bekanntem Brechungsindex kann somit die geometrische Dicke einer angelagerten Schicht gemessen werden.

Zusätzlich hat man die Möglichkeit der zeitaufgelösten Messung von Adsorptionsprozessen auf der Oberfläche. Durch die Wahl eines Laserstrahl-Einfallswinkels im nahezu linearen Bereich der Flanke des Plasmons (Abbildung 6.1.6 (a), Winkel θ_{kin}) erreicht man in guter Näherung einen proportionalen Zusammenhang zwi-

schen reflektierter Intensität und Schichtdickenzunahme [117] (s. Abbildung 6.1.6 (b)). Die Abbildung zeigt die Kinetikmessung eines Absorptionsprozesses. Man erkennt deutlich eine Verschiebung des Plasmonen-Anregungswinkels (Minimum des Plasmons) in (a) und kann in der zeitabhängigen Darstellung der Reflektivität (b) den Adsorptionsprozess verfolgen.

Der Grenzwinkel für Totalreflexion θ_{tot} (Totalreflexion gilt für $\theta > \theta_{tot}$) folgt der Beziehung (mit den Brechungsindizes für unsere Anwendung mit Gold als Metallschicht)

$$\theta_{tot} = \arcsin \frac{n_{Gold}}{n_{Prisma}}. \quad (6.1.32)$$

Aus dieser Gleichung folgt, dass sich θ_{tot} im Verlauf der Messung nicht ändert.

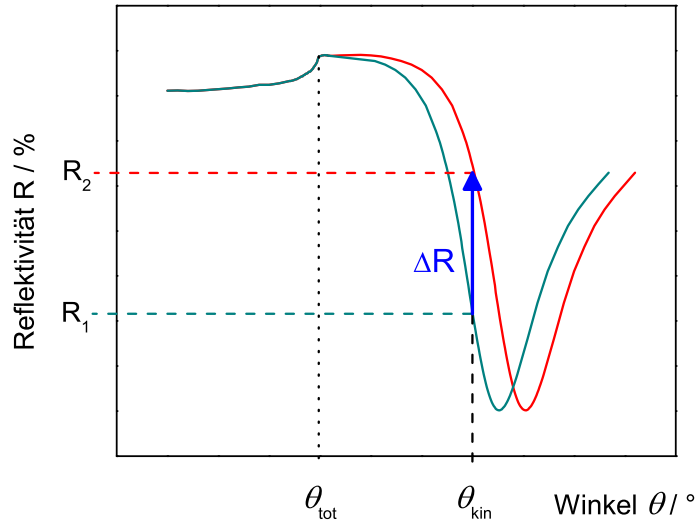
Die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie wird im Rahmen dieser Dissertation eingesetzt, um die absolute Schichtdicke von Proteinschichten zu bestimmen. Weiterhin wird sie bei allen Experimenten, bei denen das möglich ist, als Kontroll-Technik eingesetzt, um den schrittweisen Aufbau einer Protein-Schicht mit anschließender Rekonstitution in eine Membran zu verfolgen. Die Möglichkeit bietet sich bei elektrochemischen Messungen (z.B. im Rahmen von Abschnitt 9.4), da die hierfür konzipierte Messzelle kombinierte Messungen zulässt. Bei Infrarot-Messungen muss auf diese Technik der Schichtdickenbestimmung verzichtet werden.

6.1.4 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

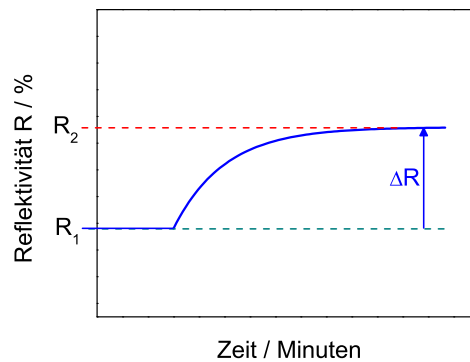
Die Rasterkraftmikroskopie, englisch „atomic Force Microscopy“, ist eine sehr hochauflösende Art der Rastersondenmikroskopie (engl. SPM, scanning Probe Microscopy) und dient zur mechanischen Abtastung von Oberflächen und der Messung atomarer Kräfte auf der Nanometerskala. Die Rasterkraftmikroskopie ist keine Mikroskopie im klassischen Sinne, da nicht direkt auf die Probe geschaut wird, sondern diese vielmehr abgetastet wird.

Während der Messung wird eine an einer mikroskopisch kleinen Blattfeder- dem Cantilever- befestigte Spitze zeilenweise in einem definierten Raster über die Oberfläche einer Probe geführt. Der Cantilever besteht meist aus Silizium oder Siliziumnitrid, der Krümmungsradius der Spitze liegt in der Größenordnung von

6.1 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR)



(a)



(b)

Abbildung 6.1.6: Kinetik-Messung zur Schichtdickenbestimmung mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie. Die Verschiebung des Plasmons durch Adsorption einer dielektrischen Schicht zu höheren Winkeln (a) lässt sich verfolgen, indem man bei einem festen Winkel die Änderung der Reflektivität verfolgt (b). Dieser Winkel sollte möglichst in der Flanke des Plasmons liegen, um den Effekt zu maximieren.

einigen Nanometern. Wird die Spitze des Cantilevers in die Nähe der zu untersuchenden Probenoberfläche gebracht, so erfährt sie durch zwischen Spitze und Oberfläche wirkende Kräfte eine Auslenkung. Die Kräfte können mechanische Kontaktkräfte, Van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische Kräfte, chemische Bindungskräfte etc. sein. Die Auslenkung der Spitze wird auf den Cantilever übertragen und mittels eines Lasers gemessen, der zuvor so justiert wurde, dass er auf den Cantilever trifft und von dort in einen Detektor reflektiert wird. Das Funktionsprinzip der Rasterkraftmikroskopie ist in Abbildung 6.1.7 dargestellt.

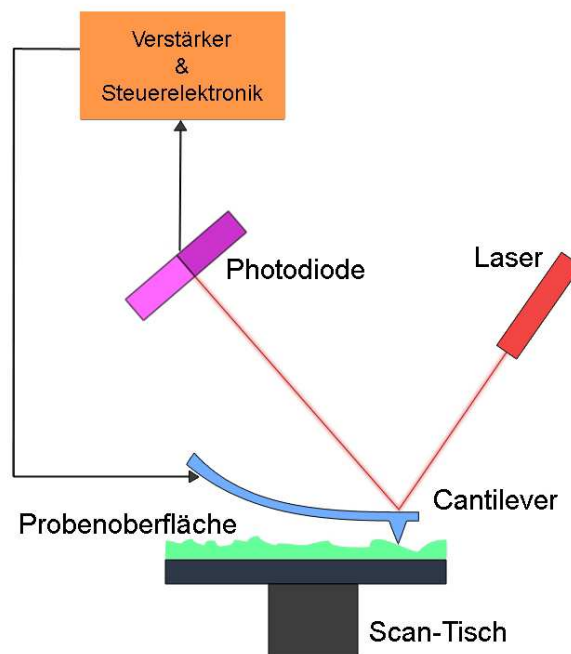


Abbildung 6.1.7: Funktionsprinzip der Rasterkraftmikroskopie (AFM). Erläuterungen s. Text.

Um zu vermeiden, dass der Cantilever während dem Abtasten der Oberfläche mit der Oberfläche kollidiert, befindet sich die Probe auf einem piezoelektrischen Scanner, der die Probe in z-Richtung (die Achse senkrecht zur Probenoberfläche) bewegt, um eine konstante Kraft beizubehalten. Gleichzeitig bewegt der Scanner die Probe während des Abtastvorgangs in x- und y-Richtung.

6.1 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR)

Es gibt mehrere Betriebsmodi der Rasterkraftmikroskopie, die im Folgenden klassifiziert werden. Beim **Kontakt-Modus**, engl. **contact Mode**, steht die Messspitze in direktem mechanischem Kontakt mit der Probenoberfläche. Da sich die Orbitale der Atome in der Spitze und an der Oberfläche nicht überlappen können (Pauli-Prinzip), entstehen starke abstoßende Kräfte, die gemessen werden. Es wird hier unterschieden zwischen dem constant Height Mode (engl. für konstante Höhe) und dem constant Force Mode (engl. für konstante Kraft). Beim constant Height Mode verbiegt sich die Abtastnadel beim Abrastern der Probe entsprechend der Struktur der Oberfläche. Es handelt sich hierbei um die älteste Messmethode der Rasterkraftmikroskopie, da an die Regelungstechnik nur sehr geringe Anforderungen gestellt sind. Im constant Force Mode wird der Aufhängungspunkt der Blattfeder mit Hilfe eines Piezostellelements so gesteuert, dass die Auslenkung des Cantilevers und damit die Kraft zwischen Spitze und Probe möglichst gleich bleibt.

Der **Nicht-Kontakt-Modus (NC-AFM, engl. non contact (nc) Mode, dynamic Mode)** gehört zur Familie der dynamischen Anregungsmodi, wobei der Federbalken durch eine externe periodische Kraft zu Schwingungen angeregt wird. Dabei wird das Prinzip der Selbsterregung ausgenutzt: das Schwingungssignal des Federbalkens wird direkt mit einer Phasenverschiebung von 90° wieder an das Anregungselement rückgekoppelt, d. h. ein geschlossener Schwingkreis entsteht. Damit schwingt der Balken grundsätzlich immer in seiner Resonanzfrequenz. Wenn jetzt zwischen der Spitze des Federbalkens und der zu untersuchenden Probenoberfläche Kräfte auftreten, so ändert sich die Resonanzfrequenz des Schwingkreises. Diese Frequenzverschiebung ist ein Maß für die Kraftwechselwirkung und wird als Regelsignal beim Abtasten der Oberfläche genutzt.

Der **intermittierende Modus (engl. intermittent contact Mode, tapping Mode)** gehört auch zur Familie der dynamischen Anregungsmodi. Im Gegensatz zum Nicht-Kontakt-Modus wird in diesem Fall die Anregung extern bei einer festen Frequenz nahe der Resonanzfrequenz des Federbalkens vorgenommen. Wechselwirkungskräfte zwischen der Spitze des Federbalkens und der Probenoberfläche verändern die Resonanzfrequenz des Systems, wodurch sich die Schwingungsamplitude und die Phase zwischen Anregung und Schwingung ändern. Meistens wird die Schwingungsamplitude als Regelsignal beim Abrastern der Probe genutzt, d.h. ein Regelkreis versucht die Amplitude konstant zu halten, indem der Abstand und

somit die Kraftwechselwirkung zwischen Balkenspitze und Probe angepasst wird. Dieser Modus wird üblicherweise bei Messungen unter Umgebungsbedingungen oder auch in Flüssigkeiten genutzt und hat dadurch weite Verbreitung gefunden. So werden alle AFM-Messungen in vorliegender Arbeit im tapping Mode durchgeführt.

Teil II

Probenpräparationen und Messaufbauten

Kapitel 7

Probenpräparationen

7.1 Präparation ultraflacher Goldoberflächen

Bedampfen von Silizium-Trägern Die Präparation ultraflacher Goldoberflächen für Experimente mit künstlichen Membranen wurde erstmals in [10] beschrieben. Die Rauigkeit wird dort mit <1 nm angegeben.

Silizium-Träger werden in einer Mischung aus Wasser, NH_3 und H_2O_2 im Verhältnis 5:1:1 bei 78°C eine Stunde lang gereinigt. Nach anschließender Reinigung mit Wasser und Ethanol werden die Wafer in Ethanol aufbewahrt, um eine neuerliche Verunreinigung zu vermeiden.

Nach Trocknen in einem Argon- oder Stickstoffstrom werden die Silizium-Wafer mit einer 50nm dicken Goldschicht bedampft. Um gleichmäßiges Aufdampfen zu gewährleisten, wird der Probenhalter der Aufdampfanlage rotiert. Die Aufdampftrate wird kleiner als $0,1$ nm/s gehalten. Es wird erst mit dem Aufdampfen begonnen, wenn in der Anlage ein Vakuum von $p < 5 \cdot 10^{-6}$ mbar herrscht. Nach Beendigung des Aufdampfprozesses werden die Wafer bis zur weiteren Verwendung erneut in Ethanol aufbewahrt.

Kleben der Goldschicht auf Glasträger LaSFN9-Glasträger werden unter fließendem Wasser von anhaftenden Glaspartikeln befreit. Anschließend werden sie in einer 2%-Hellmanex-Lösung 15 Minuten im Ultraschallbad gereinigt. Zuletzt werden die Träger gründlich mit Wasser gespült und mit Stickstoff oder Argon getrocknet. Die Glasträger werden dann mit dem Kleber EPO-TEK 353ND-4 (Brechungsindex $n=1,5922$ bei der verwendeten Laserwellenlänge 633 nm) unter

Druck durch eine Presse auf die Goldschicht geklebt. Der Kleber wird vor Gebrauch für eine Stunde bei einem Druck von $p < 5 \cdot 10^{-3}$ mbar evakuiert. Die geklebten Träger werden für 90 Minuten bei 150°C in den Ofen gestellt, damit der Kleber aushärtet. Nach dem Aushärten können die Glaträger längere Zeit aufbewahrt werden, da sie durch die auf ihnen klebenden Si-Träger geschützt werden. Die einzelnen Schritte der Präparation sind in Abbildung 7.1.1 dargestellt. Für eine Charakterisierung von auf diese Weise präparierten Goldoberflächen sei auf [10] verwiesen.

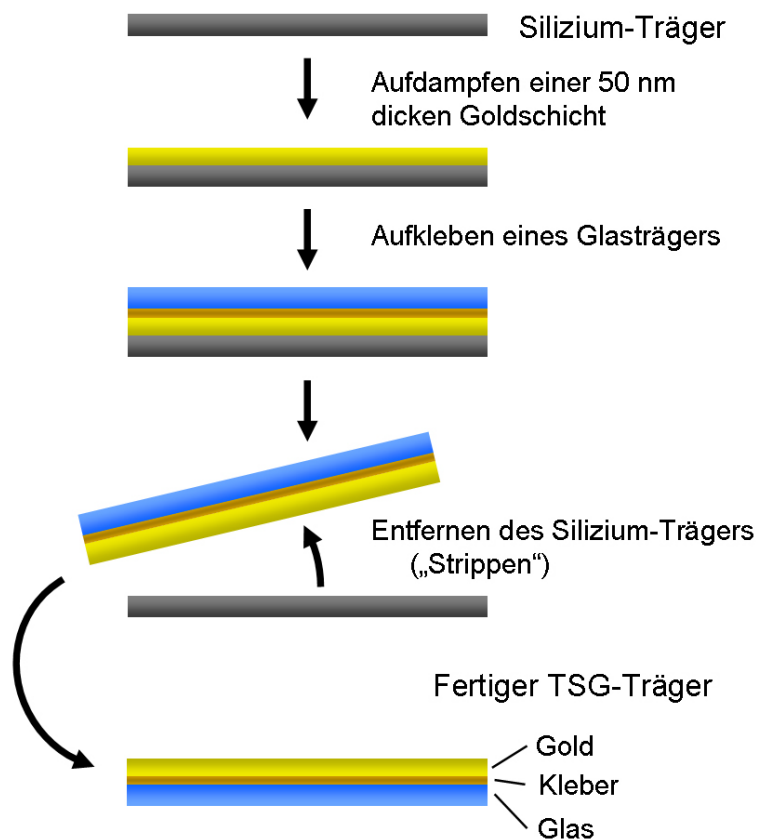


Abbildung 7.1.1: Präparation einer ultraflachen TSG-Oberfläche.

7.2 Präparation rauer Goldflächen

Die Präparation von Goldoberflächen, die aufgrund einer erhöhten Rauigkeit zu einer verstärkten Infrarot-Absorption assemblierter Schichten führen, werden gemäß [94] präpariert, wobei die Prozedur auf der Basis eigener Erfahrungen teilweise modifiziert wurde.

Der Silizium-ATR-Kristall 8.2.1.1 wird zunächst gemäß einer Vorschrift der Firma Buehler zum Polieren von Silizium-Oberflächen mit der Poliermaschine Phoenix (Buehler) poliert. Der Kristall wird manuell auf die Polierscheibe gepresst, die Umdrehungsgeschwindigkeit wird auf 150 U/min eingestellt. Der Kristall wird in drei aufeinander folgenden Schritten mit Diamantpaste feiner werdender Korngröße auf unterschiedlichen Poliertüchern poliert (s. Tabelle 7.2.1).

Poliertuch	Poliermittel	Zeit / min
TexMet P	MetaDi Supreme 9 μm	4
VerduTex	MetaDi Supreme 3 μm	4
MicroCloth	MetaDi Supreme 1 μm	3

Tabelle 7.2.1: Poliervorschrift für den Si-ATR-Kristall.

Anschließend wird der Kristall gründlich mit Ethanol gereinigt, darunter zehn Minuten im Ultraschallbad, wobei er dazu in ein Greinerröhrchen in Ethanol gelegt wird. Die Poliermaschine ist in Abbildung 7.2.1 zu sehen.

Die planare Oberfläche, auf die später das zu untersuchende System assembliert wird, wird bei Zimmertemperatur vier Minuten lang mit NH_4F bedeckt. Dazu wird mit einer Eppendorf-Pipette Flüssigkeit auf die Oberfläche getropft, bis sich ein geschlossener Film bildet. Das NH_4F entfernt die Siliziumoxid-Schicht vom Kristall.

Während dieses Prozesses wird die nächste Lösung vorbereitet: Eine spezielle Teflonwanne mit den Dimensionen des Kristalls wurde schon vorher im Wasserbad auf 70°C erhitzt und dort weiterhin auf dieser Temperatur gehalten. In diese Wanne werden folgende Lösungen in der genannten Reihenfolge hinzugegeben und mit der Pipette sorgfältig gemischt, wobei unbedingt vermieden werden muss, dass sich eine Luftblase in der Flüssigkeit befindet:



Abbildung 7.2.1: Die Poliermaschine Phoenix 4000 von Buehler.

- 700 μl 0,03 molarer $\text{Na}(\text{AuCl}_4)$
- 700 μl 2% HF
- 700 μl eines Gemischs 0,3 M Na_2SO_3 + 0,1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ + 0,1 M NH_4Cl im Verhältnis 1:1:1

Anschließend wird die NH_4F -Lösung vorsichtig in ein Kunststoff-Abfallgefäß geschüttet. Der Kristall wird 120 Sekunden mit der planen Oberfläche in die Wanne gelegt. Die Flussssäure reduziert den Metallkomplex, so dass Gold auf die Oberfläche adsorbiert wird.

Anschließend wird der Kristall ausführlich mit MilliQ-Wasser abgespült. Um Verunreinigungen zu entfernen, wird die Goldoberfläche abschließend elektrochemisch gereinigt: In 0,1 M H_2SO_4 werden fünf Scans mit einer Scan-Rate von 50 mV/s von 0,1 bis 1,4 V durchfahren. Danach wird der Kristall erneut mit MilliQ-Wasser gereinigt und bis zur weiteren Verwendung in MilliQ-Wasser aufbewahrt.

7.3 Präparation einer Protein-verankerten Lipid-Membran (ptBLM) mit der Cytochrom c Oxidase

Für die Präparation aller biologischen Proben wird deionisiertes Wasser aus einer MilliQ-Anlage verwendet. Die Protein-verankerte Lipid-Membran wurde erstmals in [13] beschrieben. Die Präparation erfolgt hier analog. Experimente mit der Technik der Oberflächenresonanz-Spektroskopie werden auf ultraflachen Goldschichten (Template stripped Gold, TSG) durchgeführt. Mit demselben Messaufbau können auch elektrochemische Experimente durchgeführt werden. Dies ist zweckmäßig, da eine ultraflache Goldschicht das biomimetische Membransystem wenig beeinflusst (im Gegensatz zu der absichtlich rau zu wählenden Goldoberfläche bei den Experimenten der oberflächenverstärkten Infrarot-Spektroskopie, s. Abschnitt 9.1).

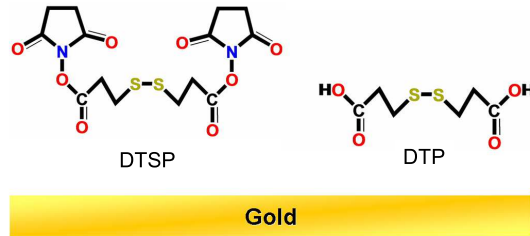
7.3.1 Präparation der Spacer- bzw. Ankerregion

Funktionalisierung der TSG-Oberfläche Die Funktionalisierung folgt zum großen Teil [13], teilweise wurden Optimierungen vorgenommen.

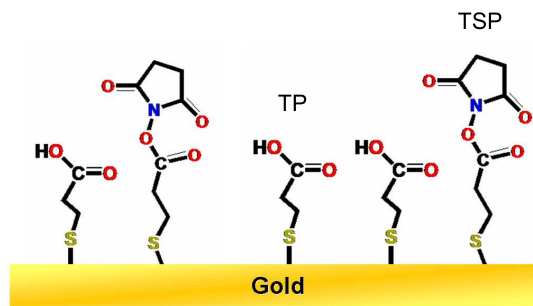
Unmittelbar vor der Funktionalisierung werden die Glasträger von den Si-Wafern getrennt („gestrippt“). Es sollte wieder drauf geachtet werden, dass die Goldoberfläche möglichst nur wenige Sekunden der Umgebungsluft ausgesetzt ist, bevor der Träger in eine DTSP/DTP-Lösung in wasserfreiem DMSO ¹ gegeben wird. Das Mischungsverhältnis beträgt 0,6Mol DTSP zu 0,4 Mol DTP bei insgesamt 5mMol/l. Im Rahmen dieser Arbeit wird auch untersucht, welches das optimale Mischungsverhältnis ist (s. Abschnitt 9.4). Es bildet sich ein gemischter Monolayer aus TSP und TP-Molekülen (s. Abbildung 7.3.1 (b)). In (a) sind die Dimere der beiden Moleküle abgebildet. Vor Bildung der Thiolatbindung bricht die Disulfidbindung auf.

Nach 120 Minuten werden die Träger aus der Lösung entnommen, die Oberfläche mit DMSO, anschließend mit Ethanol und zuletzt mit Wasser abgespült. Im nächsten Assemblierungsschritt wird der Träger mit ANTA funktionalisiert. Die wässrige ANTA-Lösung (150 mM) wird durch Lösen von 44mg ANTA und 66,7

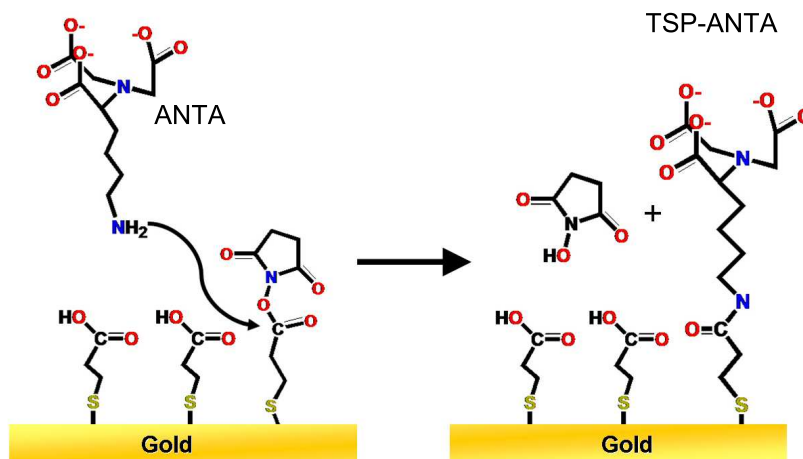
¹Erklärung der Abkürzungen im Anhang



(a)



(b)



(c)

Abbildung 7.3.1: Die Moleküle (a) DTP und (b) DTSP im Vergleich.

7.3 Präparation einer Protein-verankerten Lipid-Membran (ptBLM) mit der Cytochrom c Oxidase

mg K_2CO_3 in 1ml Wasser hergestellt, wobei die Lösung mit HCL auf einen pH-Wert von 9,8 titriert wird. Für ein Standard-Assemblierungsgefäß werden 7 ml Lösung benötigt. Das ANTA reagiert mit dem TSP, welches ein Aktivester ist, zu einem TSP-NTA-Addukt und einem Succinimidylring, der in Lösung geht. ANTA bindet nicht an die TP-Gruppe, so dass diese Moleküle als Verdüner-Moleküle fungieren (s. Abbildung 7.3.1 (c)). Nach diesem zweiten Assemblierungsschritt wird mit Wasser gespült. Wichtig ist hier ein sehr gründliches Spülen, da sich sonst im nächsten Schritt Nickelhydroxid bilden kann, falls etwas von der basischen ANTA-Lösung zurückbleibt. Im dritten Schritt des Schichtaufbaus wird der Träger in eine Nickel-Lösung gegeben, so dass die NTA-Gruppen durch die Komplexierung von Ni^{2+} -Ionen aktiviert werden. Die Ni-Lösung wird durch Lösen von 4,75 g NiCl_2 auf 500 ml Wasser und Zugabe von 1,5 ml Essigsäure hergestellt. Die Lösung wird mit KOH auf einen pH-Wert von 5,5 titriert. Nach 30 Minuten wird mit Wasser gespült.

7.3.2 Anbindung der Cytochrom c Oxidase an die Ankergruppe und Rekonstitution der Proteinschicht in eine Lipid-Membran

Membranproteine müssen in Lösung mit Hilfe eines Detergens stabilisiert werden. Die Cytochrom c Oxidase liegt daher als 100nmolare Lösung in DDM vor. Vor der Proteinanbindung wird der funktionalisierte TSG-Träger in die Messzelle eingebaut und 0,1 gewichtsprozentige DDM-Lösung in PBS wird hineingegeben. Schließlich wird die Protein-Lösung hineingegeben, welche erst kurz vorher aufgetaut wird (Aufbewahrung der Protein-Proben bei -80°C). Zwei der sechs Histidin-Gruppen des Histidin-Ankers besetzen die zwei restlichen Plätze des sechsfach koordinierten Ni^{2+} -Komplexes. Nach 45 Minuten werden die nicht angebondenen Proteine durch Spülen mit DDM entfernt. Es sollte nicht länger gewartet werden, um unspezifische Anbindung zu vermeiden (s. Abbildung 9.5.6).

Der letzte Schritt im Schichtaufbau des ptBLM-Systems ist die Rekonstitution der Protein-Moleküle in eine Lipid-Membran. Hierzu wird mittels Dialyse das Detergens von den Protein-Molekülen entfernt, gleichzeitig werden Lipid-Moleküle freigesetzt, die spontan eine Lipid-Doppelschicht um die Proteine herum bilden.

Damit dieses Zusammenspiel funktioniert, müssen folgende Vorschriften berücksichtigt werden: Lipid-Lösung 2 mg DPhyPC auf 1 ml PBS wird für 1 Stunde quellen gelassen. Anschließend wird die Lösung zehn Minuten gevortext. Von dieser Stammlösung wird eine Menge von z.B. 0,5 ml in DDM auf eine Endkonzentration von 0,01 mg/ml verdünnt. Sie muss dann über Nacht stehen gelassen werden, damit sich Lipid-Mizellen bilden, die von Detergens-Molekülen eingeschlossen sind (s. Abbildung 7.3.2). Die Lipid-Stammlösung kann eingefroren werden. Diese Lipid-Lösung tauscht die in der Zelle vorhandene DDM-Lösung aus, wobei anschließend Biobeads hinzugegeben werden. Das Volumen der Biobeads soll etwa 1/3 des Gesamt-Zellvolumens ausmachen. Die Biobeads absorbieren langsam das Detergens und setzen somit die Lipid-Moleküle frei. Die Dialyse dauert etwa 25 Stunden. Insgesamt lässt man die Dialyse über zwei Nächte laufen. Die Zelle wird danach mit PBS gespült (keinesfalls mit DDM, da man damit die Membran wieder zerstören würde!). Die Biobeads werden dabei vorsichtig mit heraus gespült.

In Abbildung 7.3.2 ist der Vorgang der Dialyse dargestellt. Rechts sieht man das fertige ptBLM-System.

7.3.3 Untersuchungen am ptBLM-System, Arbeiten ohne Sauerstoff

Alle weiteren Messungen werden in PBS-Pufferlösung durchgeführt. Für sauerstofffreies Arbeiten wird die PBS-Lösung zunächst in einem externen Gefäß zwei Stunden mit Argon durchgespült. Anschließend wird ein Sauerstoff-Zehrsystem hinzugegeben (Konzentration in der PBS-Lösung: 0,3% w/w Glucose; 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Glucose Oxidase; 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Katalase [118]). Die Lösung wird dann ständig langsam durch die Zelle durchgepumpt, wobei im externen Gefäß weiterhin mit Argon gespült wird. Die Schläuche sollten möglichst kurz sein, um eine Sauerstoffdiffusion durch die Schlauchwände in die Lösung möglichst klein zu halten.

7.3 Präparation einer Protein-verankerten Lipid-Membran (ptBLM) mit der Cytochrom c Oxidase

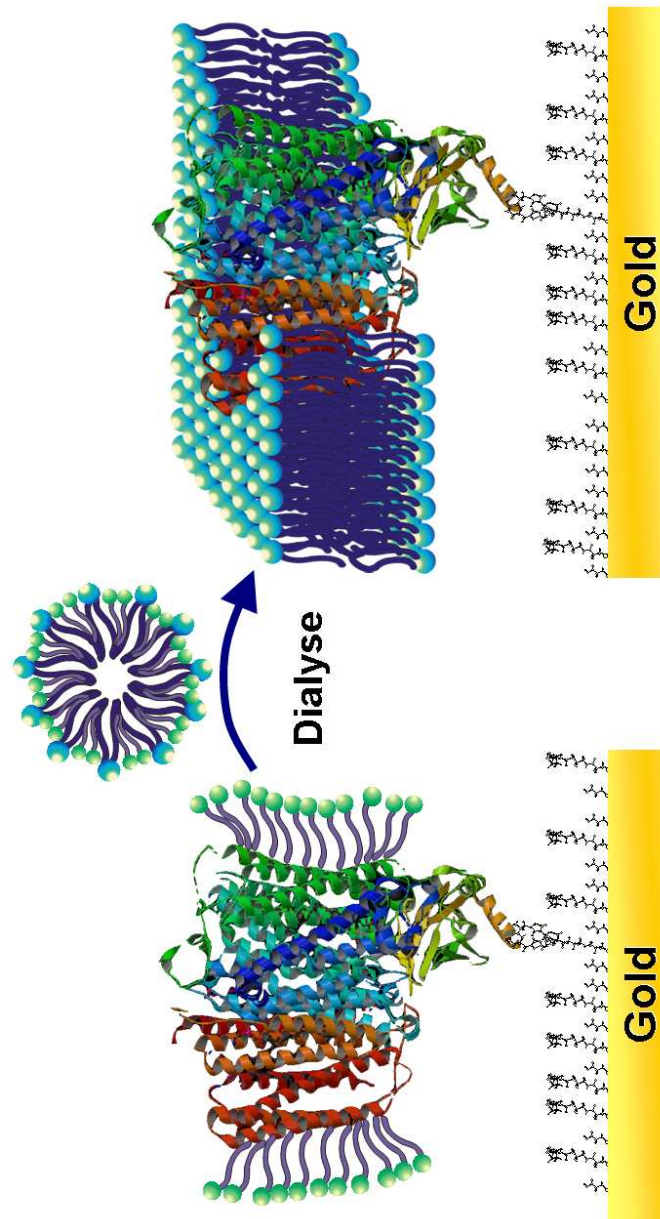


Abbildung 7.3.2: Die Dialyse. Links ist das angebundene Protein-Molekül Cytochrom c Oxidase zu sehen, das in seiner hydrophoben Region von Detergens-Molekülen geschützt wird. Rechts ist das Protein in eine Lipid-Membran rekonstituiert. Die Lipid-Mizelle (Mitte) ist ebenfalls von Detergens-Molekülen eingeschlossen, welche während der Dialyse von Biobeads absorbiert werden.

7.4 Herstellung eines DPTL-Monolayers für die Untersuchungen in Abschnitt 9.2.

Die IR-Experimente am DPTL werden auf einer gemäß Abschnitt 7.2 hergestellten elektrochemisch deponierten Goldschicht durchgeführt. Unmittelbar nach Fertigstellung der Goldschicht wird diese durch Befüllen der Messzelle mit einer 0,2mM DPTL-Lösung in Ethanol bedeckt. Nach 48 Stunden wird mit Ethanol gespült.

7.5 Herstellung einer peptidfixierten Membran und In-vitro-Exprimierung eines GPCRs für die Untersuchungen in Abschnitt 9.3.

Standardmäßig wird wie bei anders fixierten Membranen (ptBLM, tBLM) auch für diese peptidfixierte Membran eine 50 nm dicke Goldschicht auf ein LaSFN9-Glassubstrat aufgebracht. Eine aufgedampfte Goldoberfläche erfüllt dabei alle notwendigen Anforderungen, da die Peptid-Fixierung eine hinreichende Homogenität der Membran gewährleistet, eine ultraflache TSG-Schicht ist nicht notwendig. Im Rahmen der FTIR-Messungen muss das System in die für diese Arbeit konzipierte ATR-Messzelle eingebaut und damit auf die rauere elektrochemisch hergestellte Goldschicht aufgebracht werden.

Zur Herstellung einer geordneten Peptid-Monoschicht wird eine Lösung von 0,1mg/ml des Peptids mit der Aminosäuresequenz CSRARKQAASIKVAVSADR (P19, s. Tabelle D.1.1) aus der α -Laminin-Untereinheit auf der Goldschicht assembliert. Nach Spülen wird eine Mischung aus 150 μ l 400 mM EDC und 150 μ l 100mM NHS 10 min lang auf die peptidbedeckte Goldoberfläche gegeben, um den Carboxy-Terminus der Laminin-Ketten zu aktivieren. Die NHS/EDC-Mischung wird durch eine Lösung von 0,2mg/ml DMPE in PBS mit 0,003% (w/v) Triton X-100 ersetzt. Nach einer Reaktionszeit von 60 min wird erneut gespült. 300 μ l einer Lösung aus 1% PC werden mit Hilfe eines Vesikel-Extruders mit einem Polycarbonatfilter (Porendurchmesser 50nm) extrudiert, um unilamellare Vesikel zu erzeugen. Die resultierende Vesikel-Emulsion wird direkt auf die Oberfläche gegeben und nach 90-minütiger Inkubation bei 37°C durch Waschen mit PBS

7.5 Herstellung einer peptidfixierten Membran und In-vitro-Expressierung eines GPCRs für die Untersuchungen in Abschnitt 9.3.

entfernt.

Die In-vitro-Expression des OR5-Proteins erfolgt anschließend in direktem Kontakt mit der peptidfixierten Membran, um so eine unmittelbare posttranslationale Integration des Rezeptors zu bewirken. Dazu wird ein Zellextrakt aus Kaninchen-Retikulozyten [119] zusammen mit der cDNA von OR5 auf die Oberfläche der Lipidmembran pipettiert.

Die cDNA von OR5 wird mit einer Kozak-Konsensus-Sequenz versehen [120] und in Kombination mit einem Epitop des Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) [121] in das Expressionsvektorsystem pTNT (Firma Promega) kloniert. Proteingröße und Expressionseffizienz wurden mit einem Standard-Western-Blot analysiert. Für die Bestimmung der Orientierung, in der die resultierenden OR5-Proteine in die Membran inseriert wurden, werden cDNA-Konstrukte mit unterschiedlichen Positionen der VSV-Epitop-Sequenz kloniert: ein Konstrukt mit C-terminaler und ein Konstrukt mit N-terminaler VSV-Sequenz.

Kapitel 8

Messaufbauten

8.1 Der Messaufbau für Experimente der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR) und der Elektrochemie

8.1.1 SPR-Messaufbau

Experimente der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie werden in der Kretschmann-Konfiguration durchgeführt (s. Abschnitt 6.1 und [113]). Der Laserstrahl eines He-Ne-Lasers ($\lambda=632,8$ nm) wird in ein Glasprisma (LaSFN9, $n=1,85$ bei $\lambda=633$ nm) eingekoppelt. Der Objektträger (ebenfalls LaSFN9) mit der Goldschicht wird an das Prisma gepresst, zwischen Prisma und Objektträger stellt ein Film aus Immersionsöl gleichen Brechungsindex die Kopplung her. Eine schematische Darstellung des SPR-Messaufbaus ist in Abbildung 8.1.1 zu sehen.

Strahlengang des Laserstrahls Der Laserstrahl wird mit einem mechanischen Chopper rechteckmoduliert. Mit einem Polarisator wird das Laserlicht polarisiert. Mit einem zweiten Polarisator kann die Leistung des Laserstrahls variiert werden. Der Strahl wird in das Glasprisma eingekoppelt, wird an der inneren Oberfläche der Probe reflektiert, wo es bei einem bestimmten Einfallswinkel zur Anregung eines Oberflächenplasmons kommt. Nach der Reflexion wird die Intensität des Laserstrahls mit einem Photodetektor gemessen. Probe und Detektor

sind auf einem Zweikreisgoniometer montiert, so dass bei einer winkelabhängigen Messung stets $\theta = 2 \cdot \varphi$ erfüllt ist.

8.1.2 SPR-Zelle mit elektrochemischer Kontaktierung

Die SPR-Zelle aus Teflon hat ein Volumen von 1 ml. Das kreisförmige Fenster zum Prisma hin hat einen Durchmesser von 1 cm. Mit dem Aufbau für Experimente der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie sind gleichzeitig elektrochemische Untersuchungen möglich.

Dementsprechend dient der Teil der aufgetragenen Goldoberfläche, auf die das biomimetische Membransystem adsorbiert wird (das Fenster zum Prisma), gleichzeitig als Arbeitselektrode einer Dreielektroden-Anordnung. Gegen- und Referenzelektrode tauchen in die Pufferlösung. Die Teflonzelle hat ein Innenvolumen von 1 ml. Ein zur Oberflächenvergrößerung gewickelter Platindraht dient als Gegenelektrode. Die Referenzelektrode besteht aus einem chlorierten Silberdraht, der in einem Glasröhrchen in gesättigter KCl-Lösung eintaucht. Der Kontakt zur Pufferlösung wird über einen eingeschmolzenen Platindraht hergestellt. Der sehr dünne Spalt zwischen Glas und Platindraht erfüllt die Funktion einer Membran, sie ist durchlässig für Lösungsmittel-Ionen (z.B. K^+ , Cl^-). Die elektrochemischen Experimente werden mit einem Autolab-Potentiostaten durchgeführt.

8.1 Der Messaufbau für Experimente der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR) und der Elektrochemie

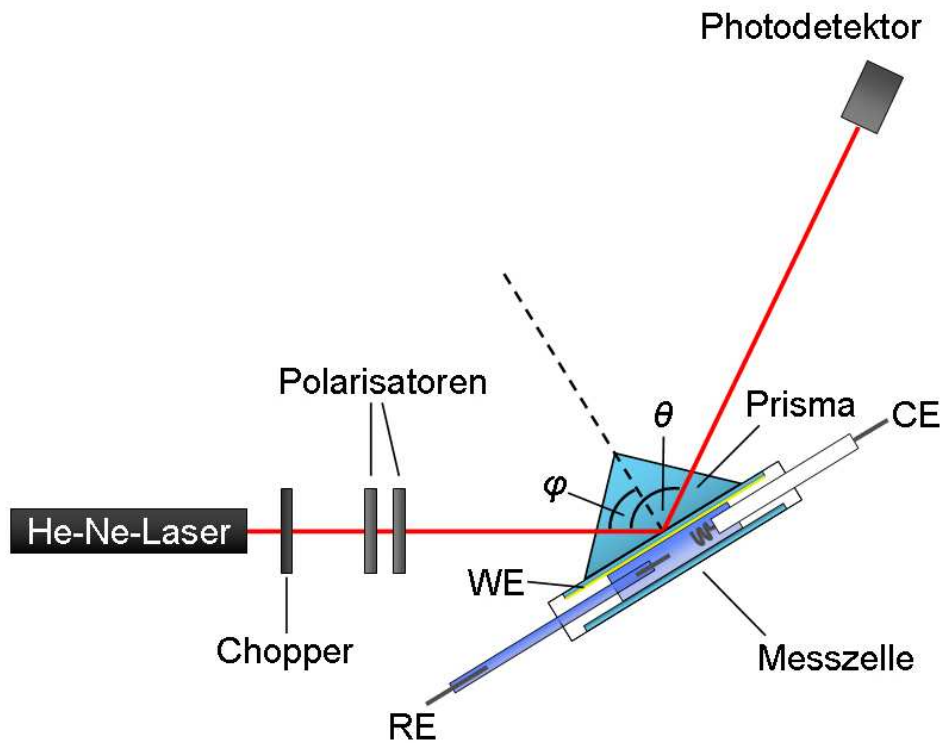
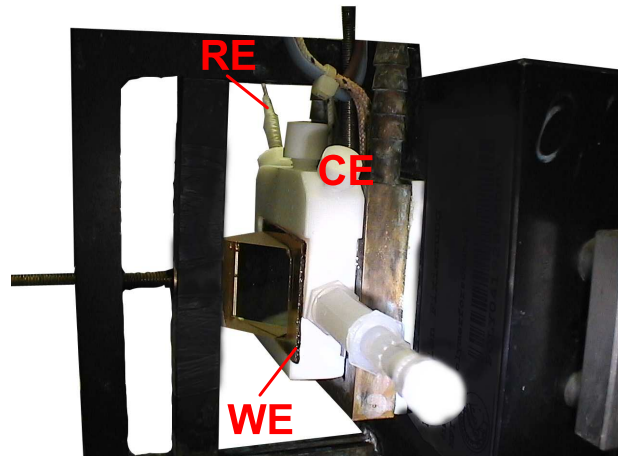
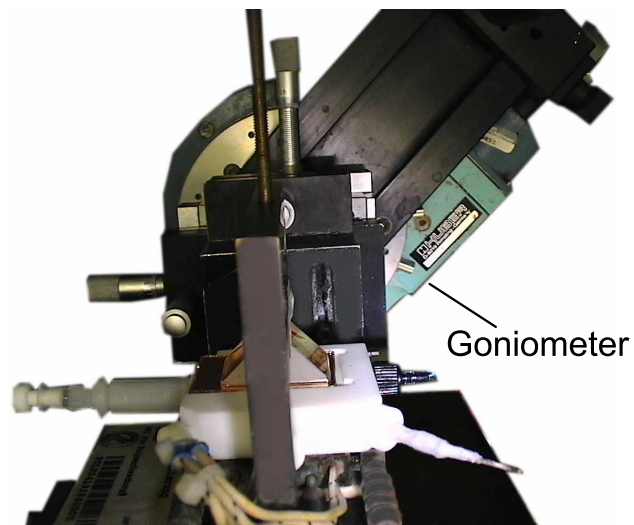


Abbildung 8.1.1: Der Messaufbau für die SPR-Experimente. Mit der Zelle sind gleichzeitig elektrochemische Experimente möglich; WE: working Elektrode (Arbeitselektrode); CE: counter Electrode (Gegenelektrode); RE: Referenzelektrode. Die einzelnen Elemente des Aufbaus sind im Text erläutert. Messzelle und Prisma sind im Verhältnis zum Messaufbau überproportional groß dargestellt.



(a)



(b)

Abbildung 8.1.2: Photos der SPR-Messzelle mit Prisma; (a) Vorderansicht mit gekennzeichneten Elektroden; (b) Draufsicht. Der Messaufbau ist auf einem Goniometer montiert.

8.2 Der Messaufbau für Experimente der elektrochemisch gesteuerten ATR-FTIR-Spektroskopie

8.2.1 FTIR-Messaufbau

Die FTIR-Messungen werden am FTIR-Spektrometer VERTEX 70 von Bruker durchgeführt (s. Abbildung 8.2.3 (b)). Das Spektrometer ist mit einer luftgekühlten Globar-Infrarotquelle, einem RockSolid-Interferometer und einem photovoltaischen MCT-Detektor ausgestattet. Es wird standardmäßig mit einer Auflösung von $\Delta\tilde{\nu}=4\text{ cm}^{-1}$ gemessen, zur Reduktion der Messzeit in zeitaufgelösten Experimenten auch mit $\Delta\tilde{\nu}=8\text{ cm}^{-1}$. Es wird mit der Auswertesoftware OPUS, ebenfalls von Bruker, gearbeitet.

Für statische Messungen wird eine Spiegelgeschwindigkeit von 60 kHz, für zeitaufgelöste Rapid-Scan-Messungen wird eine Spiegelgeschwindigkeit von 120 kHz gewählt.

8.2.1.1 Der ATR-Kristall

Der ATR-Kristall aus Silizium ($n=3,4179$ bei $10,0\text{ }\mu\text{m}$) ist in Abbildung 8.2.1 dargestellt. Die Fläche, die vom IR-Strahl beleuchtet wird, ist kreisförmig und hat einen Durchmesser von etwa 5 mm.

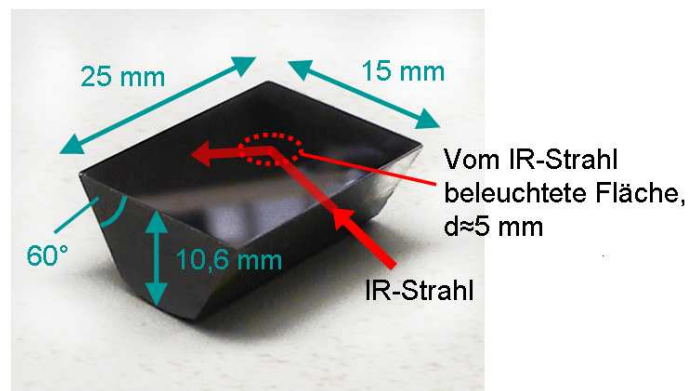


Abbildung 8.2.1: Der ATR-Kristall aus Silizium.

8.2.2 Der Probenkammereinsatz und die spektroelektrochemische Messzelle

Der Einsatz für die Probenkammer mit Messzelle ist in Abbildung 8.2.2 dargestellt. Der Infrarotstrahl wird durch einen Polarisator und einen Filter in den hemisphärischen Silizium-ATR-Kristall geführt, wo er intern reflektiert wird und dabei unter einem Winkel von 60° auf die Probenoberfläche trifft. Die kreisförmige Probenoberfläche hat einen Durchmesser von 1 cm, das Volumen der Zelle beträgt 1,2 ml. Die Probenoberfläche ist vergrößert dargestellt, wobei die Nanopartikel-Struktur angedeutet ist. Auf der rauen Goldoberfläche erkennt man schematisch eine Protein-verankerte Lipid-Membran (ptBLM). Die Lösung in der Messzelle kann über Inlet und Outlet ausgetauscht werden. Wie bereits beschrieben (s. Abschnitt 7.3.3), kann so sauerstofffrei gearbeitet werden. Die Messzelle ermöglicht in einer Drei-Elektroden-Konfiguration elektrochemische Messungen, wobei die Goldelektrode als Arbeitselektrode genutzt wird. Gegenelektrode und Referenzelektrode tauchen in die Pufferlösung. Wie in der SPR-Zelle wird als Gegenelektrode ein gewickelter Platindraht benutzt. Die Referenzelektrode ist eine Ag/AgCl-Elektrode (s. Abschnitt 8.1.2).

8.2 Der Messaufbau für Experimente der elektrochemisch gesteuerten ATR-FTIR-Spektroskopie

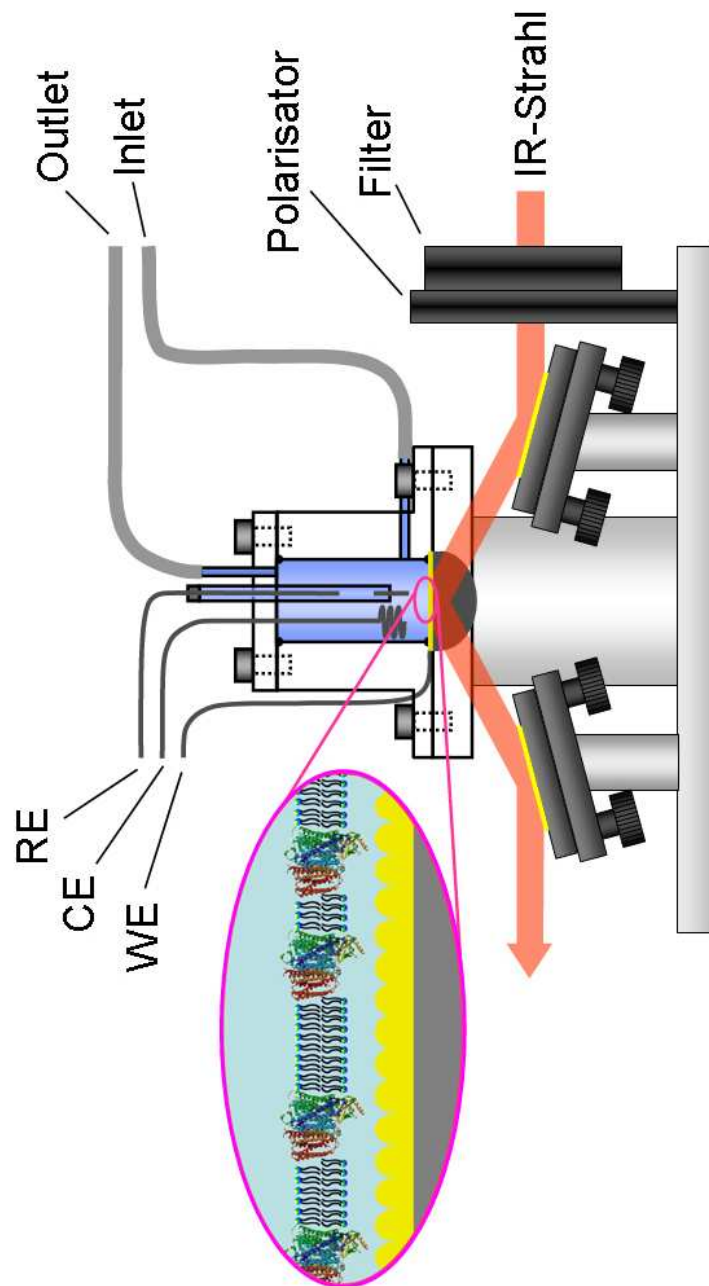
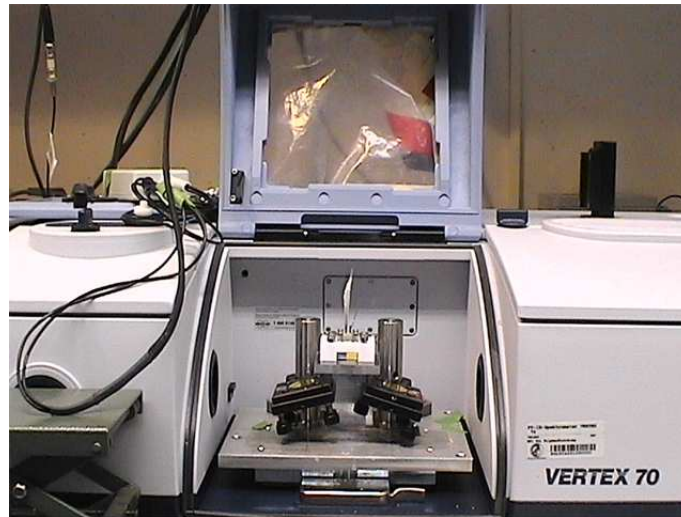
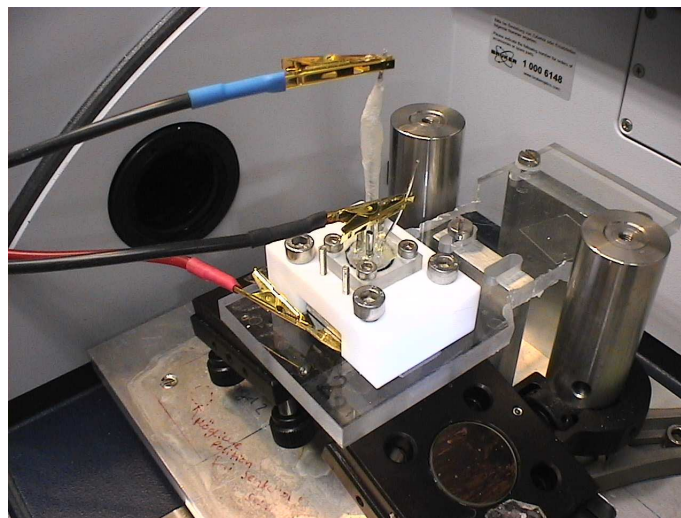


Abbildung 8.2.2: Der Einsatz für die Probenkammer des FTIR-Spektrometers mit Messzelle. WE: working Electrode (Arbeits Elektrode); CE: counter Electrode (Gegenelektrode); RE: Reference Electrode (Referenzelektrode). Der abgebildete hemisphärische ATR-Kristall wurde im Verlauf der Arbeit durch einen prismenförmigen Kristall (s. Abbildung 8.2.1) ersetzt.



(a)



(b)

Abbildung 8.2.3: Photos der Probenkammer mit Messzelle im FTIR-Spektrometer; (a) Vorderansicht der Probenkammer; (b) vergrößerte Ansicht der elektrisch kontaktierten Messzelle; rot: Arbeitselektrode, schwarz: Gegenelektrode, blau: Referenzelektrode.

8.2 Der Messaufbau für Experimente der elektrochemisch gesteuerten ATR-FTIR-Spektroskopie

8.2.3 Zeitaufgelöste ATR-FTIR-Messungen

Das Messprinzip für die spektroelektrochemischen Messungen wird hier anhand einer Rapid-Scan-Messung erklärt, anschließend wird kurz auf den Unterschied in einer Step-Scan-Messung eingegangen. Das Prinzip ist in Abbildung 8.2.4 dargestellt. Das Experiment startet mit einem Trigger durch die positive Flanke der Potenzial-Rechteckfunktion. Das Potenzial wird an dieser Stelle auf +300 mV geschaltet (a). n Spektren werden aufgenommen, jedes Mal mit der Zeitauflösung Δt (Zeitscheiben) (b). $N \cdot \Delta t$ ergibt die Messdauer für eine Periode T , der Kehrwert hiervon ist die Anregungsfrequenz. Nach Ablauf einer Periode wird erneut getriggert. Unter (c) ist schematisch der Redoxzustand des Proteins dargestellt, die Kurve repräsentiert in Wirklichkeit nur ein einziges Redoxzentrum.

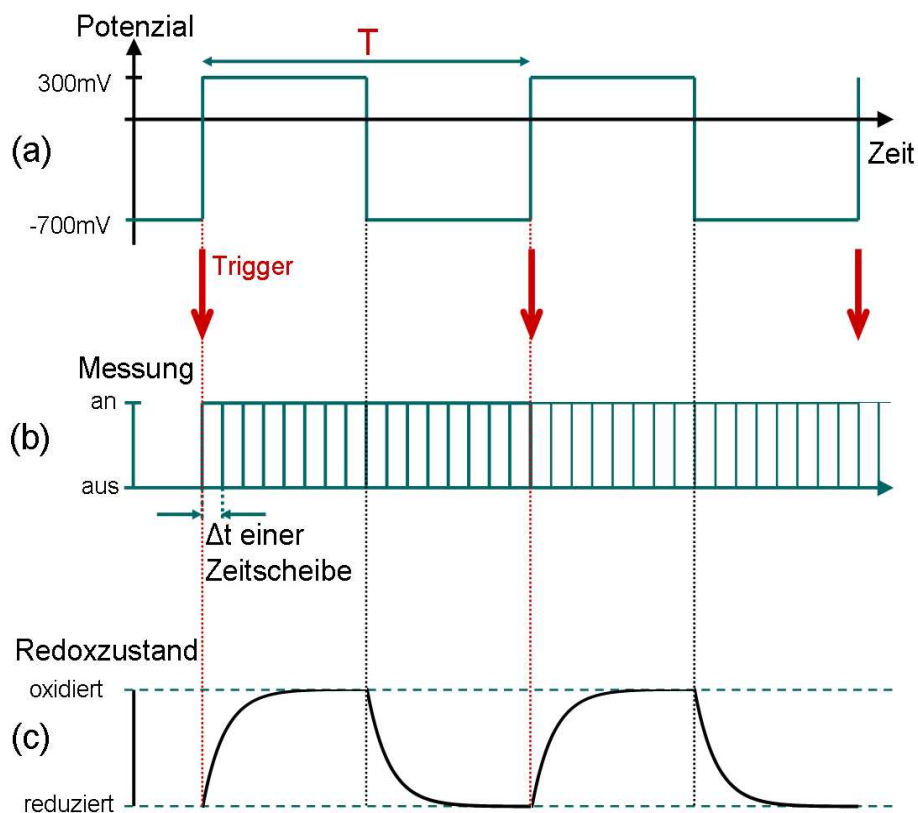


Abbildung 8.2.4

Dieses wird während der ersten Halbperiode der Anregungsfunktion oxidiert, der

Oxidationsvorgang ist durch einen exponentiellen Anstieg dargestellt und wird auch durch eine monoexponentielle Funktion angefitet. In der zweiten Halbperiode wird das entsprechende Redox-Zentrum reduziert. Die Anregungsfrequenz wird von einem Funktionsgenerator vorgegeben, welcher zugleich das Trigger-Signal für den Start der Messung im IR-Spektrometer sendet. Im Rapid-Scan-Modus ist es auch möglich, den Potentiostaten mit TTL-Pulsen durch das Spektrometer zu triggern.

Dieser Anregungsvorgang ist bei Rapid-Scan- und bei Step-Scan-Messungen der Gleiche. Der Unterschied besteht darin, dass im Rapid-Scan-Modus während einer Zeitscheibe ein Scan gemessen wird, also einmal das ganze Absorptionsspektrum. Im Step-Scan-Modus hingegen wird ein Interferogrammpunkt gemessen, das Interferogramm wird erst nach Abschluss der Messung zusammengesetzt und in das zeitabhängige Absorptionsspektrum umgerechnet. Der komplette Messaufbau ist in Abbildung 8.2.5 dargestellt.

8.2 Der Messaufbau für Experimente der elektrochemisch gesteuerten ATR-FTIR-Spektroskopie

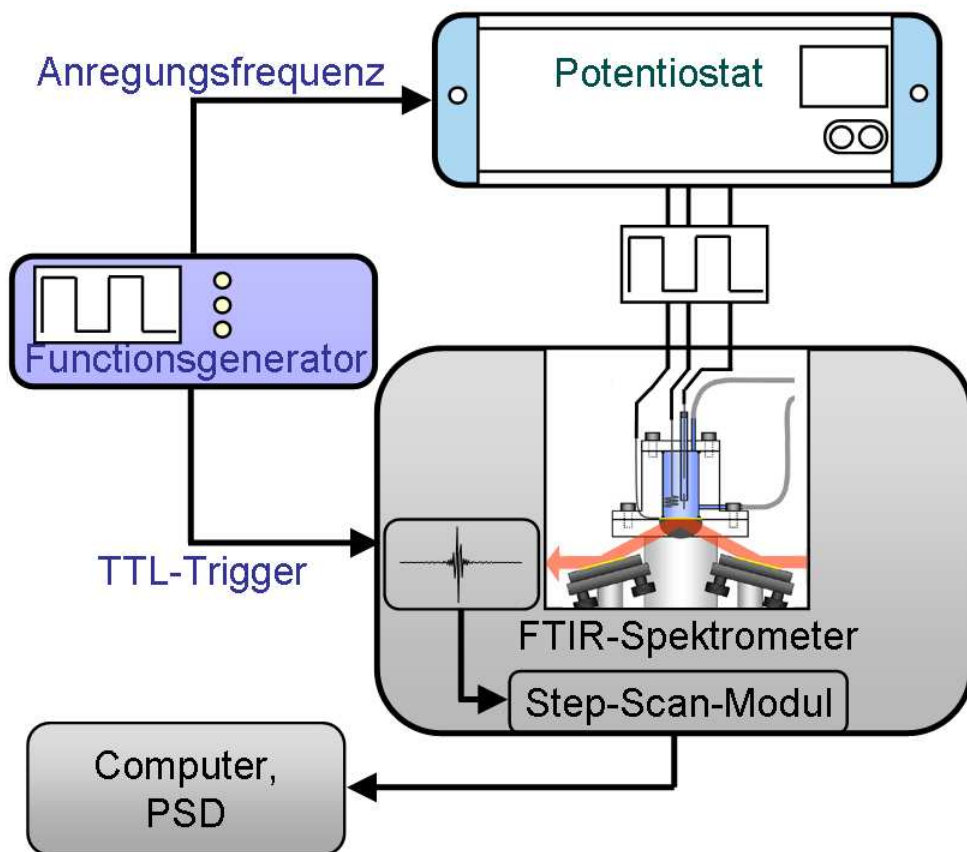


Abbildung 8.2.5: Kompletter Messaufbau für zeitaufgelöste ATR-FTIR-Experimente.

8.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

8.3.1 Probenherstellung

Die Messungen zur Analyse der Struktur der Oberfläche von aufgedampftem bzw. chemisch deponiertem Gold (s. Abschnitt 9.1) werden direkt am Silizium-ATR-Kristall oder an Silizium-Trägern mit gleichen Oberflächenabmessungen durchgeführt.

Für die Messungen im Rahmen von Abschnitt 9.4 wird TSG-Gold mit anschließender Probenpräparation auf AFM-Specimen mit einem Durchmesser $d=1$ cm durchgeführt. Alle Messungen werden im tapping Mode durchgeführt.

8.3.2 Messaufbau

Die Vermessung trockener Proben wie z.B. reiner Goldoberflächen wird mit dem Rasterkraftmikroskop Dimension 3100 CL von Veeco durchgeführt. Mit diesem sind Messungen an großen Proben (bis zu 15 cm) möglich, so dass Proben im Originalzustand vermessen werden können. Messungen von Proben, die einer wässrigen Umgebung bedürfen (insbesondere Protein-Schichten), werden mit dem Rasterkraftmikroskop Multimode Tuna/Torsion von Veeco in einer speziellen Flüssigkeitszelle durchgeführt.

8.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

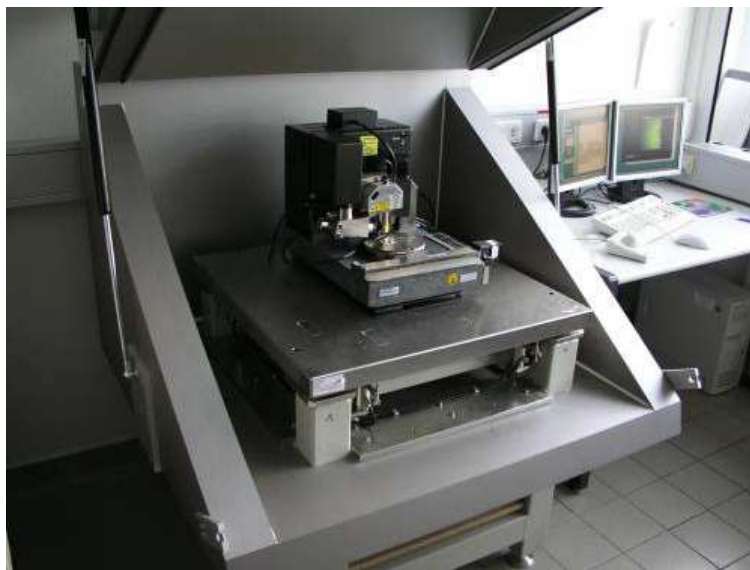


Abbildung 8.3.1: Das Rasterkraftmikroskop Dimension 3100 CL zur Vermessung trockener Oberflächen. Mit diesem Gerät sind Messungen an großen Proben möglich (bis zu 15cm), so dass Proben im Originalzustand vermessen werden können und es keiner speziellen Präparation z.B. auf AFM-Specimen bedarf.



Abbildung 8.3.2: Das Rasterkraftmikroskop Multimode Tuna/Torsion zur Vermessung von Oberflächen in wässriger Lösung. Proben werden auf AFM-Specimen mit einem Durchmesser von 1 cm präpariert. Es muss in einer speziellen Flüssigkeitszelle gemessen werden.

Teil III

Ergebnisse und Diskussionen

Membranproteine wurden in der Vergangenheit mit verschiedenen künstlichen Membransystemen untersucht (s. Abschnitt 1). Verankerte Lipid-Membranen (tethered Bilayer Lipid Membranes, tBLMs) haben Vorteile gegenüber anderen Systemen (schwarze Lipid Membranen, black lipid membranes, BLMs; festkörpergestützte Membranen, solid supported Bilayer Lipid Membranes, sBLMs) und wurden daher in den vergangenen Jahren intensiv erforscht (u.a. [8] [9] [10] [11] [12]). TBLMs mit Oligoethylenglycol-Spacergruppen ([10]) oder mit Peptid-Spacergruppen wurden auf Oberflächen immobilisiert ([11]). TBLMs erfüllen die wichtige Voraussetzung eines ausreichend großen Submembranraums. Dieser dient zum einen als Ionenreservoir. Zum anderen ermöglicht er Membranproteinen eine Inkorporation in die Membran unter Erhaltung ihrer Funktionalität. In [122] wurde GIR- und ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung der Konformation der als Spacergruppen verwendeten Peptide eingesetzt.

Wie bereits erläutert (s. Abschnitt 1) stellen Protein-verankerte Lipid-Membranen (protein-tethered Bilayer Lipid Membranes, ptBLMs) hinsichtlich einiger Aspekte eine deutliche Verbesserung gegenüber tBLMs dar, insbesondere dadurch, dass hier die Größe des Submembranraums durch die Größe des Proteins selbst und durch die Lage des Histidin-Ankers am Protein definiert wird. In [14] wird der Schichtaufbau dieser neuen Methode erstmals systematisch mittels oberflächenverstärkter ATR-FTIR-Spektroskopie untersucht.

In vorliegender Arbeit wird die ptBLM-Technologie eingesetzt und optimiert. Der Messaufbau selbst wird mit dem Ziel eines besseren SNR verbessert. Es zeigt sich, dass das System in der in [14] beschriebenen Form zwar die Ausbildung einer Membran mit rekonstituierten Proteinen ermöglicht, die Funktionalität der Proteine aber stark eingeschränkt ist. Mit dieser Optimierung befasst sich der erste Abschnitt des Ergebnisteils dieser Arbeit, wobei der optimierte Messaufbau auch für zwei Anwendungen mit tBLMs zum Einsatz kommt. Das System wird anschließend analysiert und charakterisiert. Es soll darüber hinaus gezeigt werden, dass das ptBLM-System auch für andere Membranproteine als die Cytochrom c Oxidase ein gut funktionierendes System darstellt. Mit dem optimierten ptBLM-System und dem verbesserten Messaufbau können zeitaufgelöste ATR-FTIR-Messungen an Proteinen durchgeführt werden (zweiter Abschnitt des Ergebnisteils).

Die Ergebnisse der einzelnen Kapitel sind teilweise bereits publiziert, teilweise

submitted oder noch in Vorbereitung (s. Curriculum Vitae am Ende der Arbeit).

Kapitel 9

ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung des Aufbaus von verankerten Lipid-Membranen (tBLMs und ptBLMs)

In diesem Abschnitt wird zunächst der Oberflächenverstärkungseffekt am Testsystem Laminin bestimmt. Dabei wird auch die raue Goldoberfläche durch Rasterkraftmikroskopie charakterisiert. Anschließend werden zunächst zwei Systeme untersucht, die nicht zum Hauptthema „Cytochrom c Oxidase“ gehören und die sich als weitere Anwendungsmöglichkeiten für das ATR-FTIR-Setup ergeben haben (Abschnitt 9.2 und 9.3). Im Weiteren wird das ptBLM-System mit der Cytochrom c Oxidase systematisch untersucht. Der schichtweise Aufbau („Layer-by-Layer-Formation“) der einzelnen Lagen wird jeweils mit ATR-FTIR-Spektroskopie verfolgt (Abschnitt 9.5). Anschließend folgt eine Studie zur Aktivitätsoptimierung der CcO als Funktion der Packungsdichte (Abschnitt 9.4). Hierbei kommen auch umfangreiche elektrochemische Messungen zum Einsatz.

9.1 Der Oberflächenverstärkungseffekt

Der Oberflächenverstärkungseffekt durch eine raue Goldoberfläche wurde in verschiedenen Arbeiten beschrieben (s. Abschnitt 4.3.3) und meist mit einem Faktor von ca. 20-40 angegeben. Auch für die hier verwendete Gold-Präparation, die in

[94] beschrieben wird, wurden in derselben Publikation Testmessungen präsentiert, die einen Verstärkungseffekt in dieser Größenordnung belegten. An dieser Stelle soll dennoch noch einmal eine Messung des Oberflächenverstärkungseffekts durchgeführt werden. Dabei geht es darum, die Methode nachzuvollziehen und zu zeigen, dass die Präparation einer verstärkenden Goldschicht gelingt. Hinzu kommt, dass die berichteten Messungen immer an kleineren Molekülen durchgeführt wurden, nicht aber an Polypeptiden bzw. Proteinen. Hier wird das Polypeptid Laminin als Testsystem benutzt. Laminine sind Glykoproteine und ein Bestandteil der extrazellulären Matrix. Man findet sie in allen Basallaminae, sie haben Bindungsstellen für Zelloberflächenrezeptoren. In Abbildung 9.1.1 ist ein Laminin-Molekül abgebildet. Es besteht im Wesentlichen aus Polypeptidketten und ist daher im IR-Spektrum anhand von Amid-Banden zu beobachten.

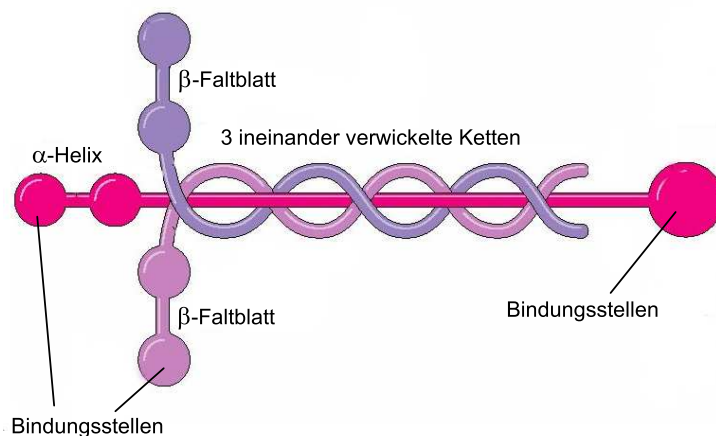


Abbildung 9.1.1: Schematische Darstellung eines Laminin-Moleküls. Laminine bestehen aus drei Proteinketten, die sich in heterotrimerer Form zum jeweiligen Laminin-Molekül zusammensetzen.

9.1.1 Oberflächencharakterisierung des Goldfilms mittels AFM

Um den Oberflächenverstärkungseffekt durch eine raue Goldoberfläche zu bestimmen, wird eine 20 nm dicke Goldschicht auf einem ultraflachen Silizium-Träger

9.1 Der Oberflächenverstärkungseffekt

nach der in [94] beschriebenen Methode präpariert. Die Oberflächenstruktur wird mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) analysiert, die RMS-Rauigkeit beträgt 5,8 nm (s. Abbildung 9.1.2 (a)). Es zeigt sich, dass die Goldoberfläche aus Nanopartikeln besteht, die laterale Abmessungen von 10-50 nm und eine Höhe von 5-25 nm aufweisen. Zum Vergleich wird eine ebenfalls 20 nm dicke Goldschicht auf einen Silizium-Träger aufgedampft und mittels AFM vermessen (s. Abbildung 9.1.2 (b)). Die Rauigkeit beträgt 0,9 nm.

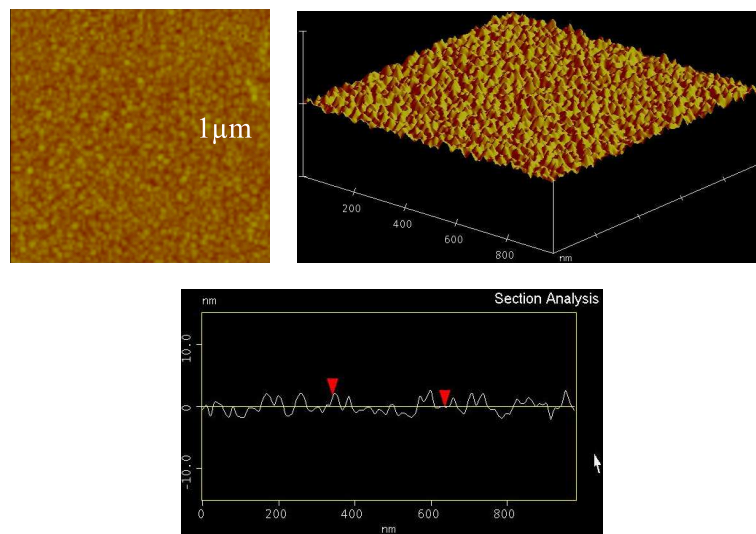
9.1.2 Bestimmung des Oberflächenverstärkungseffekts

Auf die Goldschichten wird ein Laminin-Monolayer assembliert, wobei die Konzentration Laminin im Lösungsmittel Wasser 0,25 mg/ml beträgt. Die Anbindungsdauer beträgt 30 Minuten. Die ATR-FTIR-Messung Laminin auf glattem Gold wird mit der Laminin-Messung auf rauem Gold verglichen (Abbildung 9.1.3). Man erkennt bei beiden Messungen die Amid-Banden I und II. Vergleich der Absorptionen liefert für die Amid-I-Bande einen Verstärkungseffekt von $(1,57 \cdot 10^{-2} / 0,26 \cdot 10^{-2}) = 6,17$ und für die Amid-II-Bande einen Verstärkungseffekt von $(2,9 \cdot 10^{-2} / 0,58 \cdot 10^{-2}) = 5$.

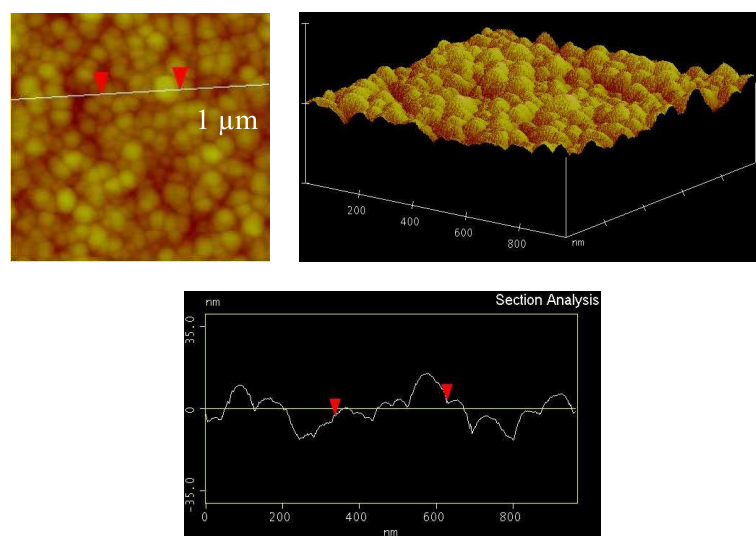
9.1.3 Diskussion von Abschnitt 9.1

Aus den präsentierten Messungen ergibt sich ein Oberflächenverstärkungseffekt von fünf bis sechs. Diese Größenordnung kann auch in weiteren Testmessungen bestätigt werden. Damit liegt die Oberflächenverstärkung unter den Literaturwerten von 20-40. Eine Erklärung für diese Diskrepanz liegt in der Größe der Testmoleküle. In den zitierten Veröffentlichungen wurden kleine Moleküle wie z.B. Benzoesäure [90] mit einer Länge von nur 6 Å verwendet. Die untersuchten Laminin-Moleküle wie auch die in vorliegender Arbeit untersuchten Proteine, die zu etwa 10 nm dicken Schichten assembliert werden, sind deutlich größer. Der Oberflächenverstärkungseffekt ist nach [91] nach 10 nm aber bereits auf etwa 1/10 abgefallen, wodurch der kleinere Verstärkungseffekt für große Moleküle zu erklären ist.

ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung des Aufbaus von verankerten Lipid-Membranen (tBLMs und ptBLMs)



(a)



(b)

Abbildung 9.1.2: AFM-Aufnahmen von aufgedampften Gold (a) und Gold, welches mit der in Abschnitt 7.2 beschriebenen chemischen Depositionsmethode auf den Si-Kristall aufgebracht wurde (b). Für (a) beträgt die RMS-Rauigkeit $0,90\ \text{nm}$, für (b) beträgt die RMS-Rauigkeit $5,83\ \text{nm}$. Die Schichtdicke beträgt in beiden Fällen $20\ \text{nm}$. In der 3D-Ansicht ist deutlich die Nanopartikel-Struktur der rauen Goldoberfläche (b) zu erkennen.

9.2 Wechselwirkungen eines Thiolipid-Monolayers mit wässriger Elektrolyt-Lösung und Auswirkungen auf die elektrischen Eigenschaften des Monolayers

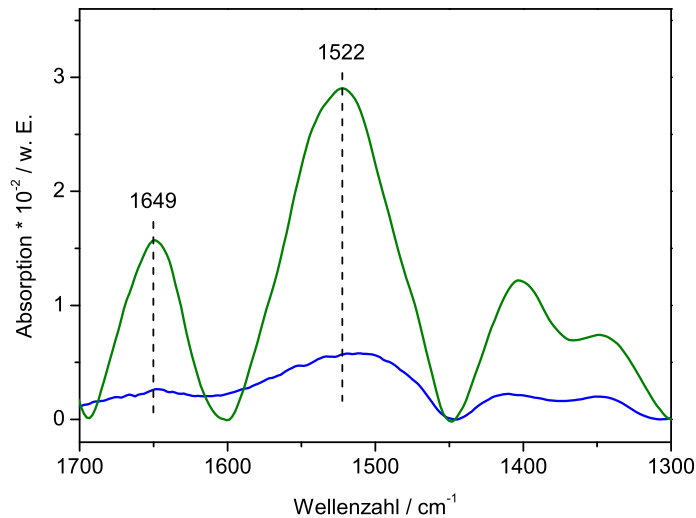


Abbildung 9.1.3: IR-Absorptionsspektrum eines Laminin-Monolayers nach 30 Minuten Anbindungszeit auf rauem Gold (grün) und auf glattem Gold (blau). Man erkennt in beiden Spektren Amid-Peaks bei 1649 cm⁻¹ (Amid I) und bei 1522 cm⁻¹ (Amid II). Der Verstärkungsfaktor durch die rauere Goldschicht beträgt etwa sechs.

9.2 Wechselwirkungen eines Thiolipid-Monolayers mit wässriger Elektrolyt-Lösung und Auswirkungen auf die elektrischen Eigenschaften des Monolayers

9.2.1 DPTL als Anker-molekül für Lipidmembranen

Gestützte Lipiddoppelschichtmembranen (tethered Bilayer Lipid Membranes, tBLMs) als Modellsystem für die Cytoplasmamembran stellen ein sehr wertvolles Hilfsmittel für die Grundlagenforschung und biosensorische Anwendungen dar. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit hauptsächlich behandelten ptBLMs wird hier zuerst eine Membran gebildet, in die dann Proteine eingebaut werden. Die tBLMs basieren auf Lipidgruppen, die über thiolmodifizierte Oligoethylenglycol-

ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung des Aufbaus von verankerten Lipid-Membranen (tBLMs und ptBLMs)

(OEG)-Spacer an eine Metalloberfläche (bevorzugt Gold) anbinden. Nach Ausbildung des Monolayers wird dieser durch Spreitung von Lipid-Vesikeln zu einer Lipiddoppelschicht ergänzt.

Aufgabe des hydrophilen Spacers ist es, die Membran von der Metalloberfläche zu entkoppeln und Raum für eine submembrane wässrige Phase- meist mit darin gelösten Ionen- zur Verfügung zu stellen. Diese reduziert den hydrophoben Einfluss der Metalloberfläche [123] und soll durch die Nachahmung des Cytosols [7] den funktionellen Einbau von Membranproteinen ermöglichen [11].

Der robuste Aufbau von tBLMs auf planaren Goldsubstraten erlaubt zudem die Anwendung von oberflächensensitiven Analysemethoden wie SE-FTIRS und elektrochemischen Analysemethoden wie EIS.

Das im Zusammenhang mit dieser Arbeit untersuchte Thiolipid ist das DPTL (2,3-Di-O-phytanyl-sn-glycerin-1-tetraethylenglycol-D,L- α -liponsäureester) [124], dessen Aufbau in Abbildung 9.2.1 dargestellt ist.

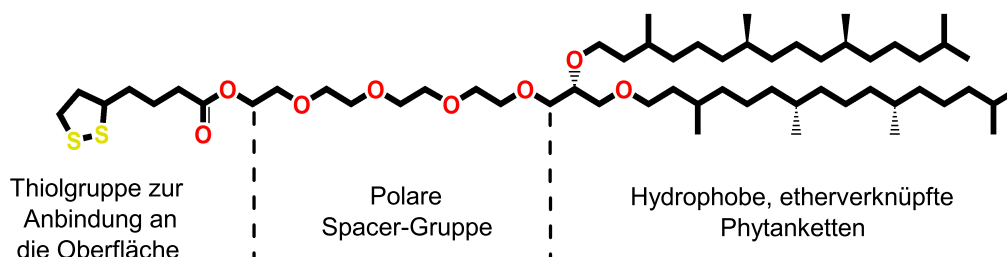


Abbildung 9.2.1: Aufbau des DPTL-Moleküls

OEG-Spacer im Allgemeinen nehmen eine gestreckte oder helikale Konformation an [125, 126, 127, 128, 129]. In [130] wurde mittels PM-IRRAS-Untersuchungen auf einkristallinen (111)-Goldschichten gezeigt, dass der OEG-Spacer im DPTL-SAM eine helikale Struktur annimmt (illustriert in Abbildung 9.2.2. In der helikalen Konformation zeigen die Sauerstoffatome innerhalb der Helices nach innen, wodurch die hydrophile Eigenschaft des OEG-Spacers abgeschwächt wird. Dies stellt einen klaren Nachteil hinsichtlich der Cytosol-Nachahmung dar, dennoch haben diese und andere Experimente gezeigt, dass DPTL ein leistungsfähiges Substrat für die Herstellung von tBLMs ist. Zum einen werden hohe Widerstandswerte bzgl. unspezifischem Ionentransport erzielt ($4,35 M\Omega$ [124]). Zum

9.2 Wechselwirkungen eines Thiolipid-Monolayers mit wässriger Elektrolyt-Lösung und Auswirkungen auf die elektrischen Eigenschaften des Monolayers

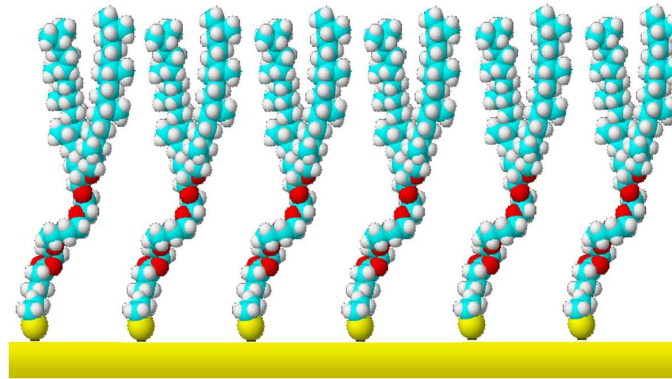


Abbildung 9.2.2: DPTL-SAM: Illustration der helikalen Struktur der OEG-Gruppe nach Adsorption auf einer Goldoberfläche.

anderen gelingt es relativ leicht, kleine Transportproteine und Kanäle einzubauen ([131, 132]) Die helikale Konformation wird durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Ethylenglycol-Einheiten stabilisiert.

Chronocoulometrie-Untersuchungen zur Ladungszahl pro adsorbiertem Molekül und zur Packungsdichte zeigen, dass der DPTL-SAM dicht gepackt ist [133]. Ein DPTL-Molekül belegt demnach eine Oberfläche von ca. 85 \AA^2 . Die fertige, durch die DPTL-Moleküle verankerte Lipid-Membran, ist praktisch undurchlässig für Wasser. Der DPTL-Monolayer hingegen verliert nach einiger Zeit seine Ordnung, wenn er von einer Wasserschicht bedeckt wird, und nimmt dann Wasser auf, wie die folgenden elektrischen Impedanzmessungen zeigen.

9.2.2 Auswirkungen der Wasserabsorption auf die elektrischen Eigenschaften des DPTL-Monolayers

In diesem Abschnitt soll gezeigt werden, wie sich der fertige DPTL-SAM verhält, wenn er mit einer wässrigen Lösung bedeckt wird. Diese Untersuchungen wurden von J. Robertson durchgeführt. In Abbildung 9.2.3 sind Widerstand und Kapazität des SAMs in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Bei $t=0$ wird der SAM in die KCL-Lösung getaucht.

Der Monolayer zeigt in den ersten 40 Minuten nach dem Eintauchen ein Anwachsen des Widerstandes von ca. $3\text{M}\Omega$ auf ca. $5\text{M}\Omega$. Gleichzeitig sinkt die Kapazität leicht ab von ca. $5\mu\text{F}$ auf ca. $4,7\mu\text{F}$. Danach sinkt der Widerstandswert auf etwa

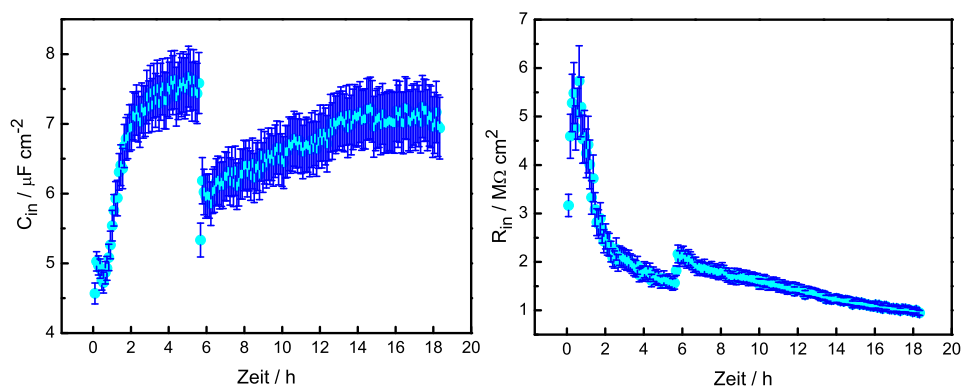


Abbildung 9.2.3: Widerstand und Kapazität des DPTL-Monolayers nach Eintauchen in KCL-Lösung in Abhängigkeit von der Zeit. Der Sprung in beiden Kurven bei knapp 6 Stunden wird durch eine in die Messzelle eindringende Luftblase verursacht.

1 $M\Omega$ nach 18 Stunden. Die Kapazität steigt auf etwa $7\mu F$. Die Stufe bei knapp sechs Stunden ist durch eine eingedrungene Luftblase zu erklären.

9.2.3 ATR-FTIR-Spektroskopie der Wasserabsorption durch den DPTL-SAM

Im Folgenden soll mittels oberflächenverstärkter ATR-FTIR-Spektroskopie gezeigt werden, wie sich die Infrarotabsorption des DPTL-Monolayers verändert, wenn er mit Wasser bedeckt wird. Damit soll eine Erklärung für das im letzten Unterabschnitt gezeigte Verhalten der elektrischen Parameter gefunden werden.

Nachweis der Assemblierung des DPTL-SAMs mittels ATR-FTIR-Spektroskopie In Abbildung 9.2.4 ist das Absorptionsspektrum eines DPTL-Monolayers nach einer Anbindungszeit von 24 Stunden abgebildet.

Mehrere Peaks lassen sich identifizieren und Schwingungen im DPTL-Molekül (s. Abbildung 9.2.1) zuordnen: Der negative OH-Peak bei 3266 cm^{-1} zeigt die Ethanol-Verdrängung durch die sich anlagernden DPTL-Moleküle. Die Banden

9.2 Wechselwirkungen eines Thiolipid-Monolayers mit wässriger Elektrolyt-Lösung und Auswirkungen auf die elektrischen Eigenschaften des Monolayers

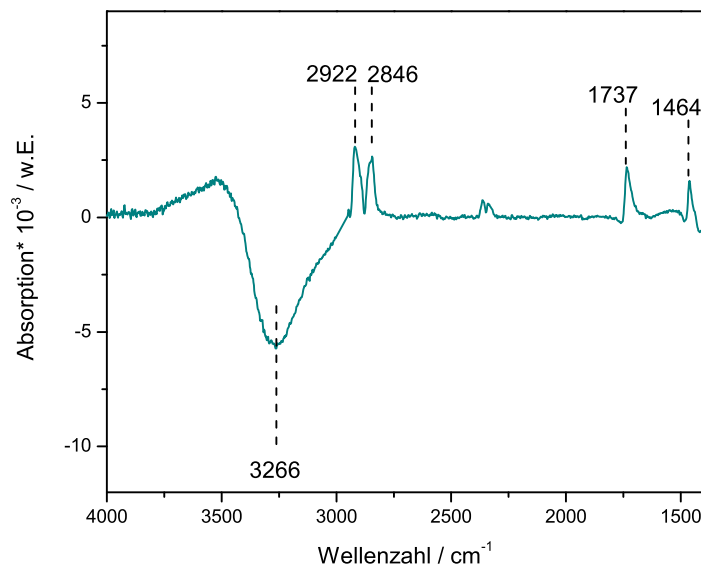


Abbildung 9.2.4: Absorptionsspektrum eines DPTL-SAMs nach der Assemblierungszeit von 24 Stunden. Die identifizierten Banden sind im Text erläutert.

bei 2922 cm^{-1} und 2846 cm^{-1} können den asymmetrischen bzw. symmetrischen CH_2 -Schwingungen zugeordnet werden (s. Tabelle D.2.1 [134]). Der Peak bei 1737 cm^{-1} kann der $\text{C}=\text{O}$ -Schwingung zugeordnet werden und der Peak bei 1464 cm^{-1} zeigt das Vorhandensein von CH_3 -Gruppen (in den Phytanketten).

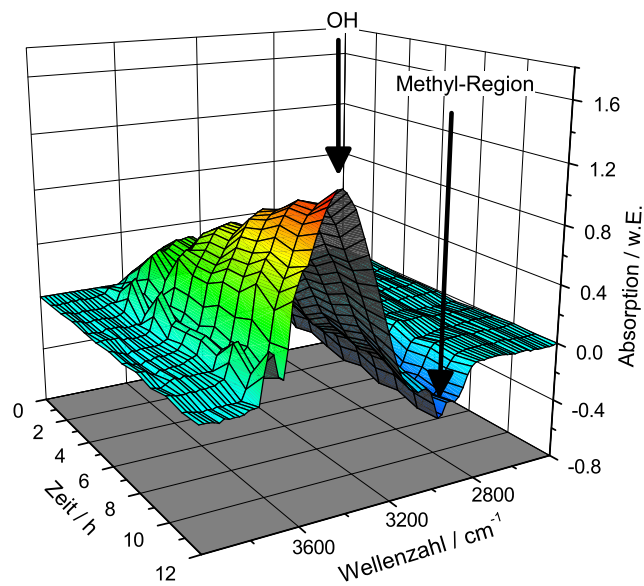
ATR-FTIR-Spektroskopie der Wasserabsorption Der fertige DPTL-Monolayer wird in der ATR-Messzelle mit einer 0,1 molaren KCl-Lösung bedeckt und Differenzspektren werden aufgenommen. Abbildung 9.2.5 (a) zeigt das Anwachsen der OH-Bande in den ersten 12 Stunden, wobei jeweils Scans über 30 Minuten aufakkumuliert werden. Als Referenz dient das erste Einzelkanalspektrum der KCl-Lösung. Die gesamte OH-Absorption wird durch Integrieren des OH-peaks bei 3440 cm^{-1} ermittelt und ist in Abbildung 9.2.5 (b) bis zu einer Zeit von 100 Stunden aufgetragen. Durch das Anfitzen einer monoexponentialen dreiparametrischen Funktion der Form

$$x = a \cdot (1 - \exp(-t/\tau)) \quad (9.2.1)$$

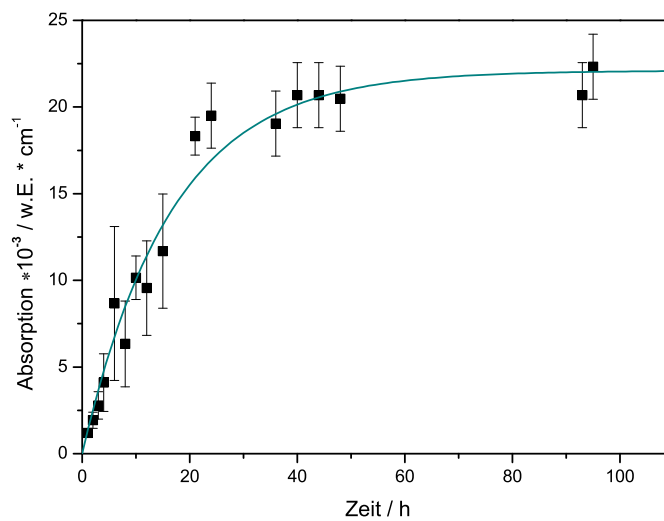
ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung des Aufbaus von verankerten Lipid-Membranen (tBLMs und ptBLMs)

wird die Zeitkonstante der Absorption bestimmt. Es ergibt sich eine Konstante von $\tau = 16,51 \pm 1,66$ h. Neben dem Anwachsen des OH-Peaks sind negative Banden im Bereich der Methyl-Streckschwingungen (s. Tabelle D.2.1) zu beobachten. Diese lassen sich durch Umorientierungen der DPTL-Moleküle durch die eindringenden Wassermoleküle erklären.

9.2 Wechselwirkungen eines Thiolipid-Monolayers mit wässriger Elektrolyt-Lösung und Auswirkungen auf die elektrischen Eigenschaften des Monolayers



(a)



(b)

Abbildung 9.2.5: (a) Zeitliche Entwicklung des OH-peaks, nachdem der DPTL-SAM in KCL-Lösung getaucht wurde; (b) Aufintegrierte Fläche des OH-peaks in Abhängigkeit von der Zeit und mono-exponentieller Fit. Die errechnete Zeitkonstante beträgt $\tau = 16,51 \pm 1,66h$.

9.2.4 Diskussion von Abschnitt 9.2

Das beschriebene Verhalten zeigt, dass zwischen dem Monolayer und der Elektrolyt-Lösung kein Gleichgewichtszustand erreicht wird. Die hydrophobe Oberfläche übt eine abstoßende Kraft gegen die wässrige Phase aus, welche die Lipide zu minimieren versuchen [135]. Dies kann im Vergleich zu anderen hydrophoben SAMs (z.B. Alkanthiole) leichter erreicht werden, da die Phytanylketten sehr flexibel sind. Im Bestreben der Oberflächenminimierung nähern sich die Lipide einander an, können so aber nicht mehr die gesamte Oberfläche abdecken und ermöglichen so das Eindringen von Wassermolekülen in den darunter liegenden relativ hydrophilen OEG-Spacerbereich. Hierdurch wird die Ordnung des DPTL-Monolayers zerstört.

Zusätzlich spielen die Ionen der KCl-Lösung eine Rolle: vor dem Eintauchen des DPTL-SAMs in die Lösung sind in der OEG-Region keine Ionen vorhanden. Mit dem Eintauchen in den Elektrolyten wird daher sofort ein Ionengradient erzeugt. Zunächst bewirkt die wasserabweisende Wirkung der Phytanylketten aber einen Ordnungseffekt des Monolayers, wodurch sich die elektrischen Eigenschaften verbessern. Anschließend nimmt der OEG-Spacer kontinuierlich kleine Mengen an Ionen und Wassermolekülen auf. Hierdurch verschlechtern sich allmählich die elektrischen Eigenschaften, d.h. sie entsprechen nicht mehr denen einer geschlossenen Schicht von verankerten Lipidmolekülen.

9.3 Inkorporation von in-vitro synthetisierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in ein peptidfixiertes artifizielles Membransystem

Bei zellulären Wechselwirkungen spielen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) eine entscheidende Rolle und zählen aus diesem Grund zu den Haupt-Targets der Wirkstoff-Forschung [136].

Die schwierigste Aufgabe bei der Untersuchung von GPCRs ist ihre Isolierung und Inkorporation in nativer Form in Mess-Systeme unter Erhaltung der an ihre räumliche Struktur gebundenen biologischen Funktion. Bei der Isolierung, die meist auf Detergenz-vermittelter Solubilisierung basiert, neigen die meisten GPCRs im Gegensatz zu anderen Proteinen wie z.B. die CcO zur Aggregation und verlieren damit ihre Funktionalität. Die Synthese des korrekt gefalteten Proteins ist daher das Haupthindernis für die Untersuchung von GPCRs.

Eine Strategie, welche die reproduzierbare Synthese und Charakterisierung eines wichtigen Vertreters der GPCRs ermöglicht, ist die Inkorporation von in-vitro synthetisierten GPCRs in ein artifizielles Membransystem. Das untersuchte Protein ist der Geruchsrezeptor OR5 aus *Rattus norvegicus*, dessen Isolierung und Untersuchung bisher nicht möglich war. Der im Rahmen dieser Dissertation geleistete Beitrag ist die Untersuchung der Ligandenerkennung des in-vitro synthetisierten Rezeptors mit ATR-FTIR-Spektroskopie.

Zunächst soll auf das System selbst näher eingegangen werden.

Bei der in-vitro Expressierung des GPCRs findet eine gerichtete Insertion des Geruchsrezeptors in eine peptidfixierte Lipidmembran statt. Zum Herstellen der Membran wird zunächst eine Peptid-Monoschicht assembliert und anschließend eine Lipid-Doppelschicht durch Vesikelfusion gebildet. Dann findet die Expression statt. Die Methode ist in Abbildung 9.3.1 schematisch dargestellt. Alleiniges Ausgangsmaterial dieser Methode ist die cDNA des GPCRs, wodurch schwierige Reinigungs- oder Isolierungsprozesse vermieden werden können.

Nach dem Aufbau der Lipiddoppelschicht erfolgt die in-vitro-Expression des OR5-Proteins in direktem Kontakt mit der peptidfixierten Membran, um so eine unmittelbare posttranslationale Integration des Rezeptors in die Membranoberfläche zu bewirken. Näheres zur Probenherstellung ist in Abschnitt 7.5 und in [137] (Ro-

ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung des Aufbaus von verankerten Lipid-Membranen (tBLMs und ptBLMs)

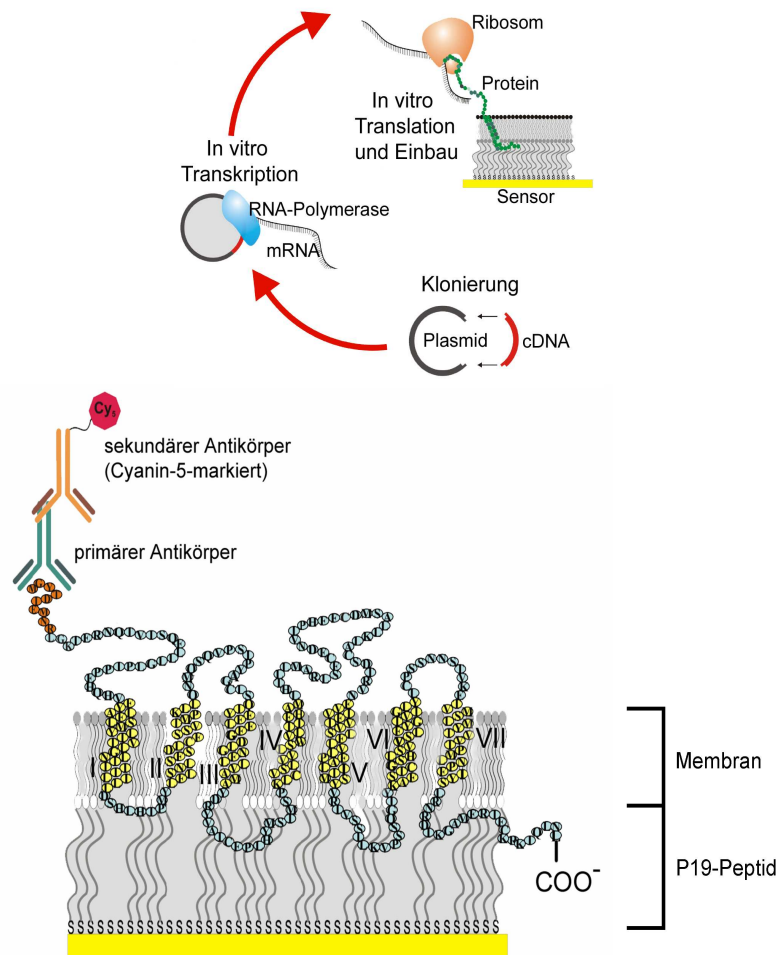


Abbildung 9.3.1: Oben: In-vitro-Synthese eines Membranproteins (z.B. GPCR) in direktem Kontakt mit einer planaren Lipidmembran. Unten: Darstellung eines in-vitro synthetisierten OR5-Rezeptors, der in eine planare Lipidmembran integriert wurde.

9.3 Inkorporation von in-vitro synthetisierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in ein peptidfixiertes artifizielles Membransystem

belek et al.) beschrieben. Die Proteinorientierung in der Membran wird durch eine Kombination von Immunmarkierung und Oberflächenplasmonen-Fluoreszenzspektroskopie (SPFS) untersucht. Damit kann eine Bindung von Anti-VSV-Antikörpern an Komponenten des Membransystems, wie dem in-vitro synthetisierten OR5, nachgewiesen werden. Dieser Teil der Forschungsarbeit war nicht Teil dieser Dissertation, weswegen auf die entsprechende Publikation verwiesen sei [137] und hier nur das Ergebnis der Fluoreszenz-Messungen referiert wird:

Die erfolgreiche Inkorporation von OR5 wird gezeigt, wobei der N-Terminus des Proteins für die Antikörperbindung zugänglich ist. Zusätzlich wird gezeigt, dass eine gerichtete Insertion des Proteins in die Membran erfolgt. Die Ausrichtung des Proteins, bei der der N-Terminus der wässrigen Umgebung auf der Membranoberseite zugewandt ist, entspricht der Orientierung von OR5 im endoplasmatischen Retikulum intakter Zellen. Es kann auch nachgewiesen werden, dass eine vollständige Membranintegration des OR5-Proteins stattfindet.

9.3.1 Nachweis der Ligandenerkennung des OR5-Geruchsrezeptors mittels ATR-FTIR-Spektroskopie

Der Nachweis, ob der Geruchsrezeptor aktiv ist, war an dieser Stelle von großem Interesse. FTIR-Spektroskopie schien sich hierfür anzubieten, zumal ein geeigneter ATR-Aufbau bereits zur Verfügung stand. Eine Ligandenbindung führt geht mit Konformationsänderungen im Protein einher, so dass Absorptionsänderungen der CONH-Gruppe zu erwarten sind. Bei Zugabe von Lilial, einem kleinen, hydrophoben Molekül, das als Ligand des OR5-Rezeptors beschrieben wurde (Abbildung 9.3.2) [138], steigt die Absorption der Amid-I-Bande im Differenzspektrum deutlich an.

Im Kontrollexperiment, bei dem eine reine Membranschicht mit einem in-vitro-Reaktionsansatz in Kontakt gebracht wurde, der keine kodierende cDNA enthält, zeigt sich kein derartiger Absorptionsanstieg. Das Kontrollexperiment ist ein wichtiger Test, denn Absorptionsänderungen im Amid-Bereich könnten auch vom Peptid-Spacer stammen, welcher mit dem Liganden wechselwirken könnte. Referenz- und Probenmessungen erfolgen so, dass eine peptidfixierte Membran, die mit In-vitro-Reaktionsmischungen ohne cDNA (Referenz) oder mit einer OR5-kodierenden cDNA-Sequenz (Probe) versehen ist, mit Lilial in Kontakt gebracht

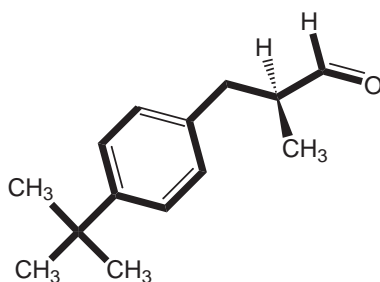


Abbildung 9.3.2: Struktur des Lilial-Moleküls

wird.

Hintergrundspektren werden unmittelbar vor, die Probenmessungen direkt nach dem Austausch des Laufpuffers (Standard-PBS) in der Proben- und Referenzkammer durch 50 μ M Lilial-Lösung (99,5% PBS / 0,5% DMSO; v/v) durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 9.3.3 dargestellt.

Diskussion von Abschnitt 9.3 Aus den IR-Messungen ergibt sich ein starker Hinweis auf eine Wechselwirkung der Ligandenmoleküle mit OR5, da die gefundenen Absorptionsänderungen der Amid-I-Bande charakteristisch für Änderungen der α -Helixkonformation von Membran-insertierten OR5-Proteinen sind. Die hohe Konzentration an Lilial wurde gewählt, um eine maximale Signalstärke zu erzielen. Daraus ist zu schließen, dass nicht nur ein gerichteter Einbau des Proteins gewährleistet, sondern auch die Funktionalität des Proteins hergestellt worden ist.

Durch ein Kontrollexperiment, in dem eine Membran ohne insertierten Geruchsrezeptor mit dem Liganden Lilial in Kontakt gebracht wird, kann gezeigt werden, dass die beobachtete Absorptionsänderung im Amid I-Bereich nicht vom Peptid-Anker stammen.

9.4 Optimierung des Aufbaus der Protein-verankerten Lipidmembran mit der Cytochrom c Oxidase

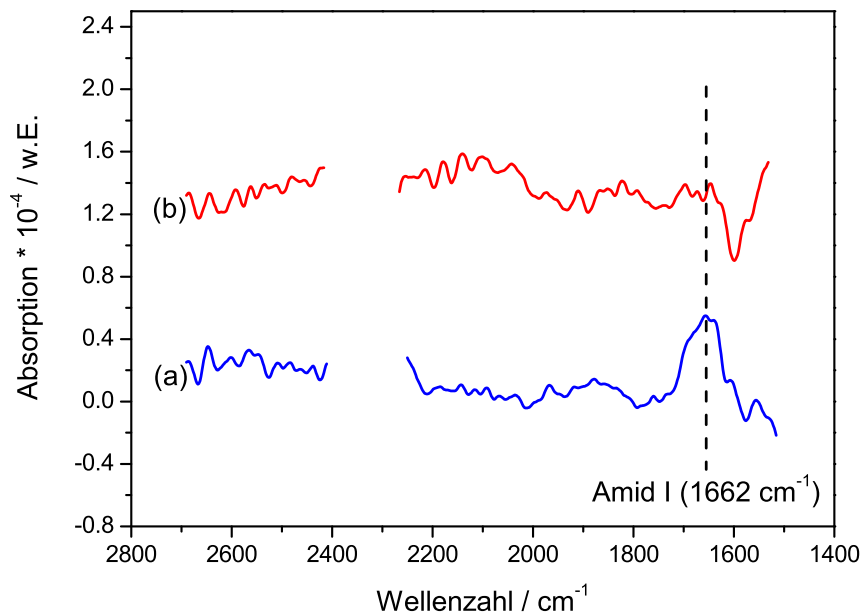


Abbildung 9.3.3: (a) IR-Spektrum eines Membransystems, das mit einem in-vitro-Expressionsansatz inkubiert wurde, der die cDNA für N-terminal VSV-markiertes OR5-Protein enthält. (b) Referenzexperiment: Membransystem, das mit einem in-vitro-Expressionsansatz inkubiert wurde, der keine cDNA enthält.

9.4 Optimierung des Aufbaus der Protein-verankerten Lipidmembran mit der Cytochrom c Oxidase

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente zur Cytochrom c Oxidase basieren alle auf der in Abschnitt 7.3 beschriebenen Probenpräparation. Im Anfangsstadium des experimentellen Teils dieser Doktorarbeit hat sich herausgestellt, dass das Protein hinsichtlich seiner Funktionalität außerordentlich empfindlich auf seine eigene Belegungsichte in der künstlichen Membran reagiert. Generell ist bei Studien an Proteinen die Herstellung bzw. Erhaltung ihrer Aktivität von elementarer Bedeutung. Dies stellt insbesondere bei Membranproteinen eine Her-

ausforderung dar, da sie in eine Lipid-Membran eingebettet werden müssen und gleichzeitig bei Kontakt mit Oberflächen leicht denaturieren. Die Methode der Protein-verankerten Lipid-Doppelschicht-Membran eröffnet neben ihren weiteren herausragenden Eigenschaften wie die definierte Orientierung der Proteine die Möglichkeit, die Oberflächenbelegung des Proteins systematisch zu variieren. Damit lässt sich überprüfen, ob Wechselwirkungen zwischen den Proteinen deren Aktivität beeinflussen. Der Abstand zwischen den einzelnen Proteinen könnte ein entscheidender Parameter sein, wenn man bedenkt, dass elektrostatische und andere Protein-Protein-Wechselwirkungen Ladungstransfer-Prozesse und weitere funktionelle Abläufe im Protein behindern könnten. Das ptBLM-System eignet sich sehr gut für eine diesbezügliche Studie, denn die Belegungsichte des Proteins kann mittels Variation der Konzentration der Komplex-bildenden NTA-Moleküle systematisch geändert werden.

Die vorliegende Studie wird mit Cytochrom c Oxidase (CcO) von *R. Sphaeroides* durchgeführt. Dieses Membranprotein soll auch als ein Beispiel für den Einfluss der Packungsdichte auf die Aktivität eines Proteins dienen.

9.4.1 Definierte Variation der Belegungsichte des CcO-Monolayers

Um die Belegungsichte des Proteins zu variieren, muss die Belegungsichte des Komplex-bildenden NTA-Moleküls variiert werden. Um dies zu erreichen, wird die Zusammensetzung des ersten Monolayers verändert: der mit einer Thiolgruppe abschließende Aktivester DTSP wird für die Funktionalisierung mit ANTA verwendet.

DTSP wird daher mit DTP vermischt, welches für die Synthese von DTSP verwendet wird und eine ähnliche Struktur hat (s. Abbildung 9.4.1). Der Unterschied besteht darin, dass DTP mit einer COOH-Gruppe abschließt, an die das ANTA-Molekül nicht koppeln kann. Die Di-Thio-Gruppen werden bei der Adsorption auf den Gold-Film gespalten, so dass aus dem DTSP zwei Thio-bis-(Succinimidyl-Propionat) (TSP)-Moleküle werden, aus dem DTP werden zwei Thio-bis-Propionat (TP)-Moleküle. ANTA reagiert mit TSP, wodurch eine Oberfläche aus NTA-Gruppen entsteht, die mit COOH-terminierten TP-Molekülen gemischt ist. Die NTA-Gruppe komplexiert dann mit einem Ni^{2+} -Ion und der Histidin-Anker der CcO bindet an den Komplex (Details zum ptBLM-System s.

9.4 Optimierung des Aufbaus der Protein-verankerten Lipidmembran mit der Cytochrom c Oxidase

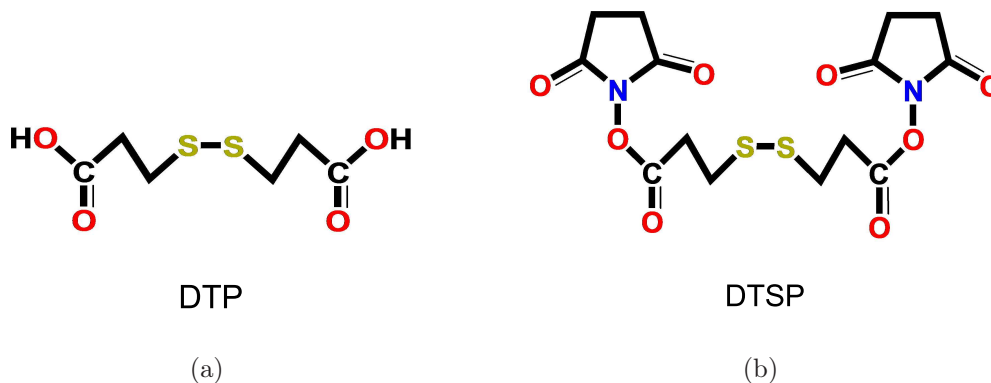


Abbildung 9.4.1: Die Moleküle DTP (a) und DTSP (b) im Vergleich.

Abschnitt 7.3). Das Verhältnis DTSP zu DTP in der DMSO-Assemblierungslösung wird in Schritten von 0,2 bis zu 1,0 variiert (entsprechend 20:80, 40:60, 60:40, 80:20 und 100:0 (w/w)), wobei die Gesamtkonzentration von 2mg/ml konstant gehalten wird. Die mit TP und TP-NTA funktionalisierte Goldoberfläche wird durch XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy, Röntgeninduzierte Photoelektronenspektroskopie) analysiert, um zu überprüfen, inwieweit das DTSP/DTP-Mischungsverhältnis in Lösung mit dem des ANTA-TP/TP-Monolayers korrespondiert. Die gleiche Fragestellung wird durch eine Modellrechnung theoretisch abgehandelt, bei der die vereinfachende Annahme gemacht wurde, es handele sich um Adsorptionsprozesse mit einer Langmuir-Isotherme. Dies kann nur bedingt richtig sein, da im Assemblierungsgefäß nicht gerührt wird und sich somit durch eine Verarmung von anbindenden Molekülen an der Oberfläche ein Konzentrationsgradient ausbildet.

9.4.2 Analyse des TP/TP-NTA-Monolayers mittels XPS-Messungen

Von jedem Mischungsverhältnis werden fünf Proben hergestellt und mit XPS auf das Verhältnis von Sauerstoff und Stickstoff zu Schwefel hin analysiert. Das ANTA-TP-Molekül enthält 7 Sauerstoffatome und 2 Stickstoffatome, das TP-Molekül enthält 2 Sauerstoffatome und keine Stickstoffatome (s. Abbildung 9.4.2). Jedes der beiden Moleküle enthält ein Schwefelatom. Somit kann für jedes Mischungsverhältnis berechnet werden, wie das Verhältnis dieser beiden Elemente

ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung des Aufbaus von verankerten Lipid-Membranen (tBLMs und ptBLMs)

in Bezug auf Schwefel sein muss. Die Oberflächenanalyse mit XPS soll zeigen, ob die Element-Verhältnisse auf der Oberfläche die gleichen wie diejenigen in Lösung sind oder ob sich Abweichungen ergeben. In Abbildung 9.4.2 sind die Ergebnisse der XPS-Messungen dargestellt. Es wurden Geraden der Form $y(x) = a + b \cdot x$ angefitet. In Tabelle 9.4.1 sind die Werte für die Fitparameter und die theoretischen Werte gegenübergestellt. Die gemessenen Werte stimmen für den Stickstoffanteil im Rahmen der Fehler sehr gut mit den theoretischen Werten überein. Bei den Werten für den Sauerstoffanteil gibt es Abweichungen: die Geradensteigung ist mit 6,2 etwa um 1/5 höher als der theoretische Wert. Der y-Achsen-Abschnitt ist mit 1,5 hingegen um 1/4 niedriger als der theoretische Wert.

Somit ergibt sich für Sauerstoff bei einem geringen Anteil ANTA-TP auf der Oberfläche ein zu niedriger gemessener Wert (für das Mischungsverhältnis 0,0 sind es 1,5 Sauerstoff-Atome pro Schwefel-Atom statt theoretischen zwei). Für einen hohen Anteil ist der Sauerstoffanteil zu hoch (7,7 statt sieben Atome pro Schwefel-Atom). Dieses Verhalten lässt sich nicht erklären. Es muss aber berücksichtigt werden, dass die theoretische Gerade mit einem y-Achsen-Abschnitt von zwei und Steigung von 5 noch im Bereich der Fehler liegt.

Es zeigt sich, dass die Ergebnisse gut mit den theoretischen Werten übereinstimmen. Lediglich beim x-Achsen-Abschnitt der Geraden für den Sauerstoffanteil ergibt sich eine relevante Abweichung, die durch den großen Fehler bei dem Mischungsverhältnis 0,6 zu erklären ist.

Parameter	Wert	Fehler	Parameter	Wert	Fehler
a (exp.)	1,5	0,2	a (exp.)	-0,059	0,248
a (theor.)	2		a (theor.)	0	
b (exp.)	6,2	0,3	b (exp.)	1,97	0,37
b (theor.)	5		b (theor.)	2	
Sauerstoff			Stickstoff		

Tabelle 9.4.1: Vergleich der Parameter der Geradenfits aus Abbildung 9.4.2 mit den theoretischen Werten.

9.4 Optimierung des Aufbaus der Protein-verankerten Lipidmembran mit der Cytochrom c Oxidase

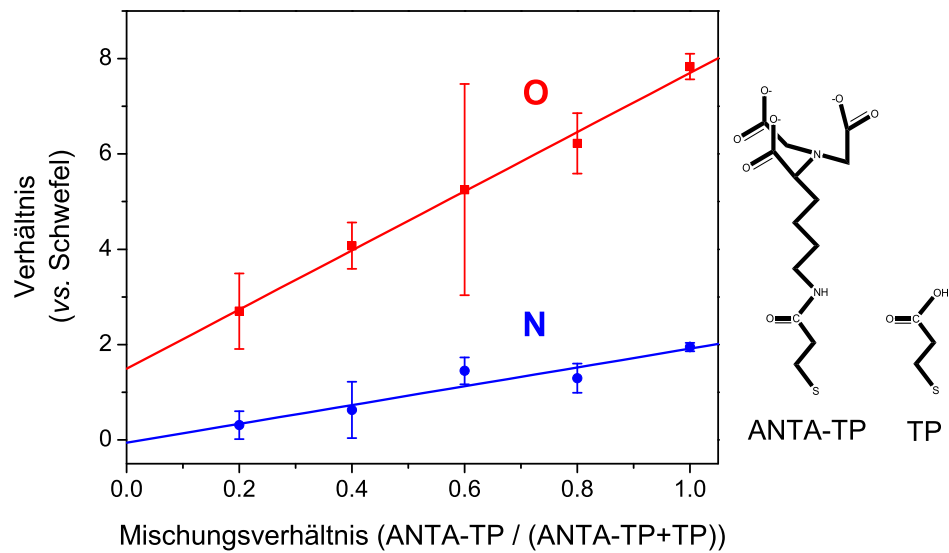


Abbildung 9.4.2: Mit XPS gemessene Elementverhältnisse Sauerstoff zu Schwefel und Stickstoff zu Schwefel auf der Goldoberfläche im Vergleich zu den Verhältnissen in Lösung.

9.4.3 Modellrechnung zur Oberflächenbelegung in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis DTSP zu DTP in Lösung

Da das DTP-Molekül kleiner ist als das DTSP-Molekül (entsprechend die gespaltenen Moleküle), ist davon auszugehen, dass ersteres aufgrund schnellerer Diffusion auf der Goldoberfläche zu einem größeren Anteil zu finden ist als in der Lösung. Mit folgender Rechnung wird dies überprüft und bestätigt.

Das Konzentrationsprofil über einer Oberfläche, auf der eine Spezies mit einer Diffusionskonstanten D_0 und einer Anfangskonzentration C_0^* bei $t = 0$ adsorbiert wird, ist durch Gleichung 9.4.1 gegeben und in Abbildung 9.4.3 skizziert.

$$C_0(x, t) = C_0^* \cdot \operatorname{erf} \left[\frac{x}{2 \cdot \sqrt{D_0 t}} \right] \quad (9.4.1)$$

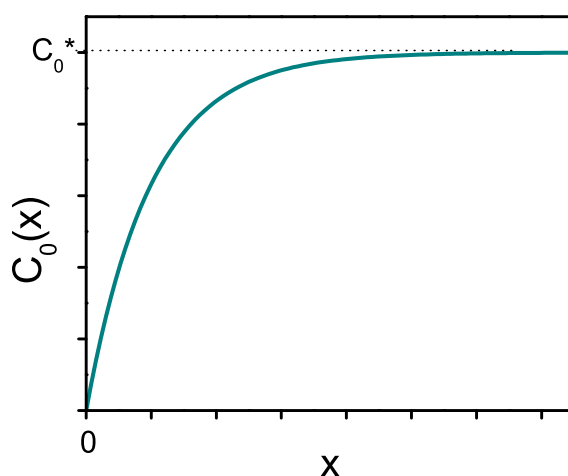


Abbildung 9.4.3: Konzentrationsprofil einer Spezies, die auf der Oberfläche adsorbiert wird.

$\operatorname{erf}(x)$ ist dabei die Gaußsche Errorfunktion, die durch

$$\operatorname{erf}(x) = \int_0^x e^{-x^2}$$

9.4 Optimierung des Aufbaus der Protein-verankerten Lipidmembran mit der Cytochrom c Oxidase

definiert ist.

Die Diffusionskonstante für ein Molekül mit dem Trägheitsradius R_G und einer Anzahl von Masseelementen σ , das in einem Lösungsmittel mit der Viskosität η gelöst ist, gilt nach Kirkwood und Riseman [139] Gleichung 9.4.2.

$$D_0 = \frac{k_B T}{f} \quad (9.4.2)$$

mit

$$f = \frac{\frac{3}{8}\sqrt{\pi} \cdot 6\pi\eta R_G}{1 + \frac{1}{2}\sqrt{\frac{\pi}{\sigma}}} \quad (9.4.3)$$

Alle Werte in Gleichung 9.4.2 sind bekannt: $\eta(DMSO) = 2 \cdot 10^{-4} \frac{Ns}{m^2}$ [140]. Die Anzahl der Masseelemente erhält man durch Abzählen: $\sigma(DTSP) = 42$, $\sigma(DTP) = 22$. Die Trägheitsradii berechnen sich gemäß Gleichung 9.4.4, wobei m_i die Massen der einzelnen Atome sind und r_i die Abstände der Atome vom Molekülschwerpunkt. Letztere werden mit dem Programm „CS Chem3D Pro“ durch einen Näherungsalgorithmus zur Energieminimierung eines Moleküls berechnet. Es ergeben sich: $R_G(DTSP) = 5,7\text{\AA}$, $R_G(DTP) = 4\text{\AA}$.

$$R_G = \sqrt{\frac{\sum_i m_i r_i^2}{\sum_i m_i}} \quad (9.4.4)$$

Die Anzahl der Teilchen, die pro Zeit- und Flächeneinheit auf die Oberfläche treffen, sind durch das 1. Ficksche Gesetz (Gesetz für die Teilchenstromdichte J) gegeben:

$$J = D_0 \cdot \left(\frac{\partial C}{\partial x} \right) \quad (9.4.5)$$

Integrieren von Gleichung 9.4.5 über die Zeit liefert die Anzahl an Teilchen, die zu einer bestimmten Zeit t die Oberfläche erreicht haben ($\hat{=}$ Teilchen pro Fläche):

$$P := \int J dt \quad (9.4.6)$$

ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung des Aufbaus von verankerten Lipid-Membranen (tBLMs und ptBLMs)

Einsetzen von 9.4.1 und 9.4.2 in 9.4.5 und Einsetzen der Zahlenwerte für die Parameter liefert

$$\frac{P_{DTSP}}{P_{DTP}} \approx 0,67 \cdot \frac{C_{0,DTSP}^*}{C_{0,DTP}^*} \quad (9.4.7)$$

Mit den beiden einfachen Beziehungen $C_{0,DTP}^* = C_0^* \cdot x_{DTP} = C_0^* \cdot (1 - x_{DTSP})$ und $P_{DTP} = P \cdot y_{DTP} = P \cdot (1 - y_{DTSP})$, wobei x und y die Verhältnisse von DTSP bzw. DTP auf der Oberfläche sind, erhalten wir als Endergebnis Gleichung 9.4.8:

$$\boxed{y_{DTSP} \approx 0,67 \cdot \frac{x_{DTSP}}{1 - 0,32 \cdot x_{DTSP}}} \quad (9.4.8)$$

Wie sich durch elektrochemische Experimente herausstellt, ist ein Mischungsverhältnis von DTSP zu DTP in Lösung von 60Mol% zu 40Mol% optimal (s. Abschnitt 9.4.5). Für ein Mischungsverhältnis von 60Mol% DTSP und 40Mol% DTP in Lösung erhalten wir mit Gleichung 9.4.8 49,75 Mol% DTSP und 50,25 Mol% DTP auf der Oberfläche. In dieser Modellrechnung wird die Sättigung auf der Oberfläche durch die bereits adsorbierten Moleküle nicht mit einbezogen. Dieser Effekt sollte aber keinen Einfluss haben, da er auf beide Molekül-Spezies gleich wirkt und beide Spezies zwar weniger, aber weiterhin den gleichen Platz angeboten bekommen.

Es kann also mit dieser Absorptions-Diffusions-Rechnung gezeigt werden, dass zwar tatsächlich das kleinere TP-Molekül auf der Goldoberfläche zu einem größeren Anteil als in Lösung zu finden ist. Es zeigt sich aber auch, dass die Abweichung nicht gravierend ist und mit einer Variation der Verdünnung in Lösung eine ähnliche Variation der Verdünnung auch auf der Oberfläche verbunden ist.

9.4.4 Vergleich der Anbindungskinetiken von ANTA auf einer unverdünnten TSP-Schicht und einer 60Mol%-verdünnten Schicht mit ATR-FTIR-Spektroskopie

In Abbildung 9.4.4 ist die Peakhöhe der Amid-I-Bande in Abhängigkeit von der Zeit während des Kopplungsprozesses von ANTA aufgetragen. Die orange-farbene Kurve zeigt die Anbindung an eine unverdünnte TSP-Schicht, die blaue Kurve zeigt die Anbindung an eine verdünnte Schicht, die mit einer 60Mol% DTSP-Lösung assembliert wurde. Nach Abschnitt 9.4.3 entspricht dies einer verdünnten

9.4 Optimierung des Aufbaus der Protein-verankerten Lipidmembran mit der Cytochrom c Oxidase

DTSP-Schicht auf der Oberfläche mit 46% DTSP.

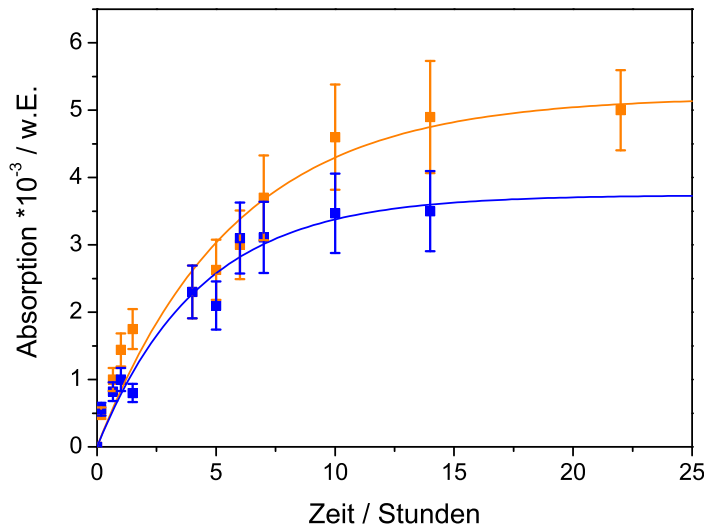


Abbildung 9.4.4: Peakhöhe der Amid-I-Bande als Funktion der Zeit während des Kopplungsprozesses von ANTA an den gemischten TSP/TP-Monolayer mit angefütteten monoexponentiellen Funktionen; orange: unverdünnte TSP-Schicht, blau: 60%-DTSP-Schicht

Die Kurven zeigen, dass die Verdünnung mit DTP weniger gebundene ANTA-Moleküle zur Folge hat. Die Kopplung ist in beiden Fällen nach ca. 24 Stunden abgeschlossen. Monoexponentielle Fits der Form $x = a \cdot (1 - \exp(-t/\tau))$ liefern für die ANTA-Kopplung an die unverdünnte Schicht eine Zeitkonstante von $\tau = 5,7h$ und für die verdünnte Schicht $\tau = 4,4h$. Die schnellere Sättigung ist mit der niedrigeren Anzahl von Bindungsstellen zu erklären (mit 46% etwas weniger als die Hälfte).

9.4.5 Ermittlung des Anteils aktiver oberflächengebundener CcO-Moleküle mittels Cyclovoltammetrie

Die Aktivität des Proteins wird durch direkte Injektion von Elektronen von der Goldelektrode in die Redoxzentren des Proteins überprüft. Details zum direkten Elektronentransfer sind in [15] (Friedrich et al.) beschrieben.

Die Abhängigkeit des Anteils der aktiven Enzyme in Abhängigkeit von der Pa-

ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung des Aufbaus von verankerten Lipid-Membranen (tBLMs und ptBLMs)

ckungsdichte, bestimmt durch das DTSP/DTP-Mischungsverhältnis in Lösung, ist in Abbildung 9.4.5 dargestellt. Aufgetragen sind die basislinienkorrigierten und auf die Scan-Rate normalisierten reduktiven Peaks von zyklischen Voltammogrammen des direkten Elektronentransfers.

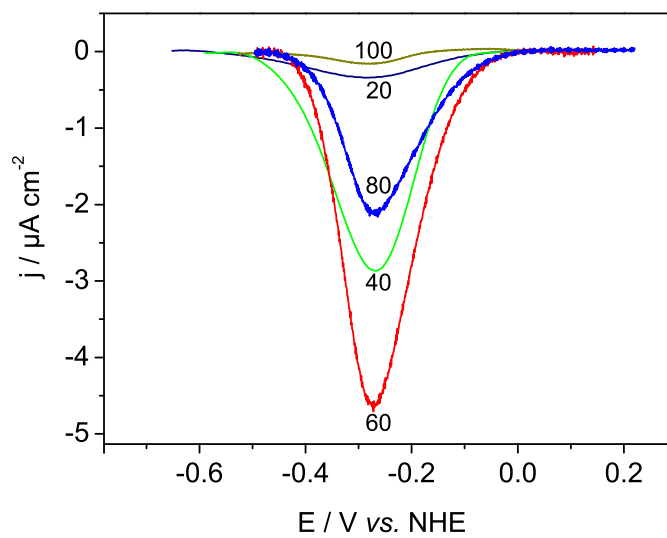


Abbildung 9.4.5: Basislinienkorrigierte und auf die Scan-Rate normalisierte kathodische Peaks von zyklischen Voltammogrammen des direkten Elektronentransfers in die CcO bei verschiedenen Mischungsverhältnissen DTSP:(DTSP+DTP).

Zum Vergleich ist ein ganzes zyklisches Voltammogramm einer voll aktiven CcO-Schicht gezeigt (Abbildung 9.4.6 (a)). Für die 20%- und 100%-DTSP-Schichten ist der reduktive Peak nur sehr schwach ausgeprägt. Deutlich ausgeprägt ist der Peak schon bei den 40%- sowie bei den 80%-Schichten, das Optimum wird bei einem Mischungsanteil von 60% DTSP.

Integration der Peakflächen liefert die Gesamtladung, die pro Zyklus übertragen wird und mit Gleichung 9.4.9 die Oberflächenbelegungsichte Γ der Redox-aktiven CcO-Moleküle. Dabei ist n die Anzahl der übertragenen Elektronen pro Protein-Molekül und F ist die Faraday-Konstante.

$$\Gamma = \frac{Q}{nF} \quad (9.4.9)$$

9.4 Optimierung des Aufbaus der Protein-verankerten Lipidmembran mit der Cytochrom c Oxidase

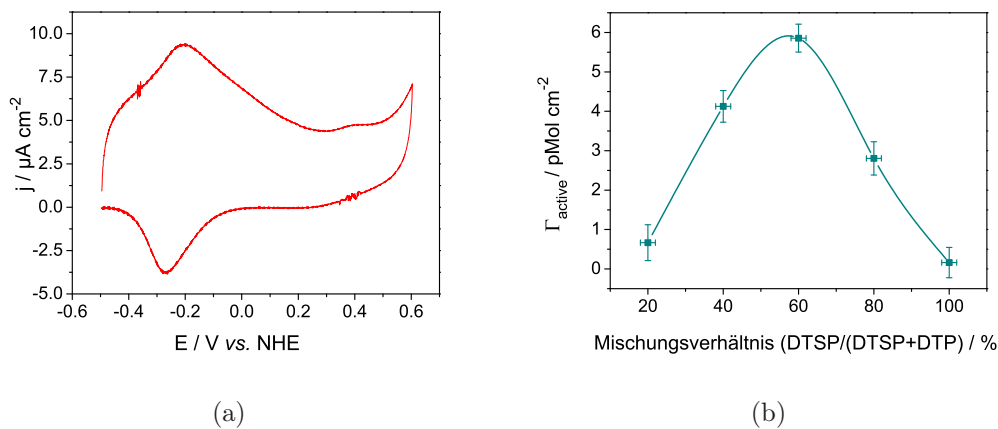


Abbildung 9.4.6: (a) Beispiel eines Cyclovoltammogramms für eine Schicht aktiver CcO-Moleküle; (b) Oberflächenbelegungsichte der aktiven CcO-Moleküle, berechnet aus den aufintegrierten Peakflächen aus Abbildung 9.4.5, in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis.

Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 9.4.6 (b) dargestellt. Der Wert für die Belegungsichte bei einem optimalen Mischungsverhältnis beträgt 5,9 pMol/cm². Dieser Wert entspricht dem Wert 6 pMol/cm², der für einen dicht gepackten CcO-Monolayer berechnet wird, der durch Langmuir-Blodgett-Transfer hergestellt wird. Dabei wird das CcO-Molekül aus *Rhodobacter Sphaeroides* ausgehend von der Kristallstruktur als Ellipsoid mit den in der Membran liegenden Halbachsen 4,5nm und 7,0nm approximiert [36]¹. Das in diesen Versuchsreihen gefundene Optimum für das Mischungsverhältnis mit einem Anteil von 60% DTSP wird als Standardwert für alle weiteren mechanistischen und kinetischen Untersuchungen des immobilisierten Enzyms benutzt- in dieser Doktorarbeit und in diversen Publikationen (z.B. [18], [19], [15])

¹die groben Abmessungen in Abschnitt 3.3 unterscheiden sich hiervon geringfügig.

9.4.6 Analyse der CcO-Anbindung und der Membran-Rekonstitution für verschiedene Verdünnungen mittels SPR und EIS

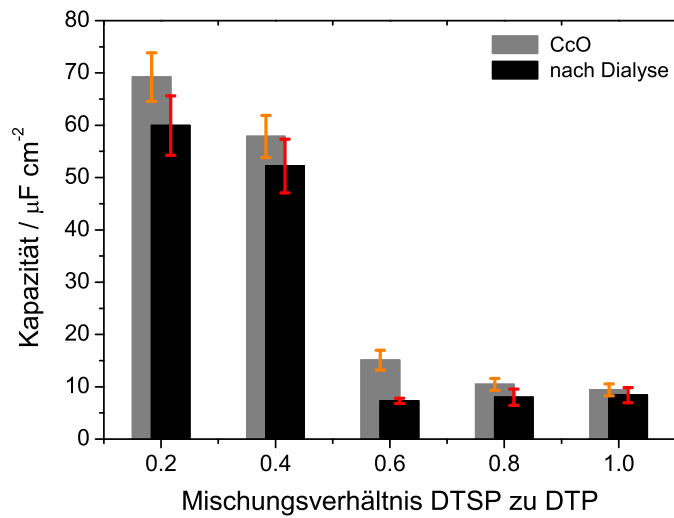
Für ein besseres Verständnis des Zusammenhangs zwischen Mischungsverhältnis und Aktivität der immobilisierten CcO-Moleküle werden Schichten unterschiedlicher NTA-TP/TP-Mischungsverhältnisse mittels SPR und EIS charakterisiert. Bei den SPR-Kurven konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Verdünnungen festgestellt werden. Eine typische SPR-Kinetik ist in Abbildung 9.5.1 zu sehen.

Charakteristische Änderungen, die mit dem Schicht-auf-Schicht-Aufbau einhergehen, sind in EIS-Spektren zu beobachten. Hier gibt es deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Verdünnungen. Eine ausführliche EIS-Analyse des Schichtaufbaus wird in Abschnitt 9.5.3 beschrieben. Abbildung 9.5.8 zeigt die Daten in Form des Bode-Plots und des Frequenz-reduzierten Admittanzplots. Mit Hilfe der Äquivalenzschaltkreise in Abbildung 9.5.9 werden die Daten angefügt und man erhält die Parameter, die die elektrischen Eigenschaften der Schicht beschreiben. Das Prozedere wird hier auf die Ergebnisse der verschiedenen Mischungsverhältnisse angewendet. Die sich aus den Fits ergebenden Werte für Kapazität und Widerstand sowohl des CcO-Monolayers als auch der Protein-Membran-Schicht sind in Abbildung 9.4.7 dargestellt. Die statistische Analyse (Fehlerbalken) ist das Ergebnis aus etwa 5 Experimenten pro Mischungsverhältnis.

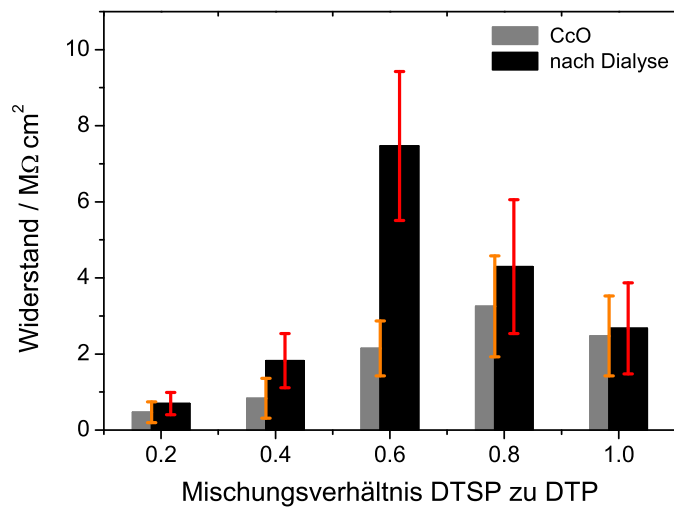
Für ein niedriges Mischungsverhältnis von 0,2 beträgt die Kapazität der Protein-Schicht $68 \pm 6 \mu F/cm^2$. Sie nimmt mit einem steigenden DTSP-Anteil zu, wobei der stärkste Anstieg zwischen 0,4 und 0,6 liegt. Für eine reine DTSP-Schicht schließlich beträgt die Kapazität $9 \pm 1 \mu F/cm^2$ (s. Abbildung 9.4.7 (a)). Nach der Rekonstitution der Lipiddoppelschicht um die Proteine herum nimmt die Kapazität für alle Mischungsverhältnisse bis auf den 100%-DTSP-Fall ab. Für die reine DTSP-Schicht gibt es in manchen Experimenten eine leichte Zunahme, in anderen ein leichtes Absinken der Kapazität.

Der Widerstand der Protein-Schicht ist bereits für alle Mischungsverhältnisse vergleichsweise hoch (Abbildung 9.4.7 (b)). Die Werte liegen zwischen $4,7 \pm 2,8 \cdot 10^5 \Omega \cdot cm^2$ für die 20%-DTSP-Schicht und $3,3 \pm 1,3 M\Omega \cdot cm^2$ für die 80%-

9.4 Optimierung des Aufbaus der Protein-verankerten Lipidmembran mit der Cytochrom c Oxidase



(a)



(b)

Abbildung 9.4.7: (a) Kapazitäten und (b) Widerstände der CcO-Schicht vor der Dialyse (grau) und der CcO-Schicht mit Membran nach der Dialyse (schwarz) als Funktion des Mischungsverhältnisses DTSP zu DTP. Die Kapazität nimmt durch die Dialyse stets ab. Das Optimum liegt bei einem Verhältnis von 60%, hier werden auch sehr gute Absolutwerte erreicht. Der Widerstand nimmt durch die Dialyse stets zu, auch hier liegt das Optimum bei 60%.

ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung des Aufbaus von verankerten Lipid-Membranen (tBLMs und ptBLMs)

DTSP-Schicht. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Enzym-Moleküle, obwohl durch den Histidin-Anker fest an die Oberfläche gebunden, dennoch keine völlig geordnete Schicht bilden. Vielmehr sind die Moleküle mehr oder weniger stark gegeneinander verkippt und kommen untereinander so nahe, dass sie eine geschlossene Schicht bilden, die das System zur Pufferlösung hin abdichtet. Diese Schlussfolgerung wird auch dadurch bekräftigt, dass der Widerstand der Protein-Schicht abnimmt, wenn man das Potential mehrere Male hintereinander einen bestimmten Bereich durchlaufen lässt. Die Erklärung hierfür ist, dass die Protein-Moleküle sich durch die Potential-Durchläufe neu ausrichten und sich teilweise aufgrund ihrer Oberflächenladungen voneinander separieren.

Nach der Rekonstitution steigt der Widerstand für alle Mischungsverhältnisse, wobei der deutlichste Anstieg zu 60% DTSP hin stattfindet. Die Werte reichen von $6,9 \pm 2,9 \cdot 10^5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ für den niedrigsten DTSP-Anteil bis zu $7,5 \pm 2 M\Omega \cdot \text{cm}^2$. Für ein besseres Verständnis dieser Veränderungen ist es sinnvoll, noch einmal die Approximation der Schichtkapazitäten durch einen Plattenkondensator zu betrachten (vgl. Abschnitt 9.5.3). Die Kapazität einer dielektrischen Schicht ist demnach durch die Dicke der Schicht und die dielektrische Konstante des Materials bestimmt (s. Gleichung 9.5.2). Die Kapazität einer reinen Protein-Schicht wird mit $6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ abgeschätzt (s. Abschnitt 9.5.3). Die für die verschiedenen Mischungsverhältnisse beobachteten höheren Werte zwischen 13,1 und $68 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ sind auf Wassermoleküle zwischen den Protein-Molekülen zurückzuführen. Die dielektrische Konstante des Lipids ist mit $\epsilon_{\text{Lipid}} = 2,2$ wesentlich kleiner als die des Wassers mit $\epsilon_{\text{Wasser}} = 80$ bzw. die des Proteins mit $\epsilon_{\text{Protein}} = 30$ ². Da ϵ in Gleichung 9.5.2 im Zähler steht, fällt die Kapazität ab, sobald Wasser durch Lipid ersetzt wird. Der niedrigste gemessene Wert ist $7,3 \pm 0,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, welcher bei einem Mischungsverhältnis von 60% DTSP erreicht wird. Der niedrigste Wert, der in einem einzelnen Experiment erreicht wird, ist $6,8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und liegt damit nahe an der berechneten Kapazität einer reinen Protein-Schicht. Dies deutet auf eine hohe Oberflächenbeladungsdichte durch das Enzym von $\geq 90\%$ hin (vgl. Abschnitt 9.5.3).

²Die Quellen für diese Werte sind ebenfalls in Abschnitt 9.5.3 angegeben.

9.4.7 Charakterisierung der CcO-Monolayer mittels AFM

Für diese Untersuchungen wurden TSG-Flächen auf AFM-Spezimen präpariert, um mit dem ultraflachen Gold möglichst wenig Einfluss auf die Topographie der Oberfläche zu nehmen (die Rauigkeit liegt unter 0,2nm). Zunächst wurden gemischte NTA-Schichten präpariert und vermessen. Hier hat sich die Rauigkeit gegenüber der reinen Goldschicht kaum verändert (s. Abbildung 9.4.8 (a)). In den Abbildungen 9.4.8 (b) bis (e) sind AFM-Messungen von CcO-Schichten auf TP-NTA-Schichten in den Verdünnungen 0,001 (b), 0,1 (c), 0,6 (d), und 1,0 (e) dargestellt. Bereits bei dem sehr niedrigen Mischungsverhältnis von 0,001 sind deutliche Unterschiede zu der reinen NTA-Schicht zu beobachten. Es sind Strukturen mit den lateralen Dimensionen von 50-80 nm und einer Höhe bis zu 15nm auszumachen. Für das Mischungsverhältnis 0,1 reichen die lateralen Abmessungen der Strukturen von 50 bis zu 180nm und in der Höhe bis zu 25nm. Diese Ergebnisse lassen sich nicht durch die Dimensionen einzelner Enzyme erklären, die durch Röntgenstrukturanalyse ermittelt wurden (6,3 nm \times 6,8 nm in der Ebene und 8,5 nm für die Höhe (s. Abschnitt 3.3 bzw. [36]). Daher zeigen diese größeren Strukturen die Ausbildung von Aggregaten an. Diese wären möglicherweise entweder auf unspezifische (also NTA-unabhängige) Protein-Adsorption oder auf eine Anlagerung von NTA-gebundenen Proteinen zurückzuführen. Bei den niedrigen Verdünnungen könnte dies durch eine hohe Flexibilität der Enzyme ohne die stabilisierende Membran erklärt werden. Bei einem Mischungsverhältnis von 0,6 werden die Strukturen deutlich kleiner. Sie haben hier laterale Dimensionen von nur noch 10-20nm und eine Höhe von \approx 10nm. Diese Abmessungen sind mit den in der Röntgenstrukturanalyse gefundenen Werten konsistent. Mit dem 60%-DTSP-Mischungsverhältnis werden die Enzyme durch die hohe Oberflächenbelegung stabilisiert. Im Fall des 1,0-Mischungsverhältnisses (also eine reine TSP-Schicht) sind die Strukturen noch kleiner. Die lateralen Abmessungen liegen bei etwa 10nm, die Höhe ist $<$ 10nm. Dies ist konsistent mit der Annahme einer sehr dicht gepackten CcO-Monoschicht. Die Rauigkeiten der unterschiedlichen Mischungsverhältnisse sind in Abbildung 9.4.8 (f) aufgetragen. Sie steigt von 0 bis 0,1 steil an und erreicht hier ein Maximum mit einer RMS-Rauigkeit von ca. 0,6nm. Zu höheren DTSP-Mischungsanteilen gehend, sinkt die Rauigkeit wieder langsam ab und erreicht bei 60% DTSP 0,54nm und für die reine TSP-Schicht einen Wert von 0,33nm. Der Anstieg bei kleinen DTSP-Anteilen ist

trivial durch die sich ausbildenden CcO-Inseln zu erklären. Dass die Rauigkeit für größere DTSP-Anteile nicht weiter zunimmt, sondern wieder zurückgeht, ist ein wichtiges Indiz dafür, dass unspezifische Protein-Anbindung nur in begrenztem Maß stattfindet. Durch die gegenüber einem kleineren DTSP-Anteil größere Anzahl an Ankerstellen bildet sich eine zunehmend homogenere Protein-Schicht aus, ohne eine über den Monolayer hinausgehende weitere Anlagerung.

9.4.8 Diskussion des Abschnitts 9.4

Es kann gezeigt werden, dass die Cytochrom c Oxidase empfindlich auf die Variation ihrer Belegungsdichte reagiert. Zu dichte Belegung führt zu einem oft vollständigen Verlust der Funktionalität, offenbar durch den Einfluss elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den Protein-Molekülen. Ist die Belegungsdichte andererseits zu gering, findet eine unvollständige Rekonstitution der Membran statt, denn diese benötigt die Protein-Moleküle als „Inseln“ zum Anlagern. In diesem Fall sind die Proteine nicht ausreichend geordnet und die Funktionalität wird ebenfalls meist erheblich beeinträchtigt. Diese Schlussfolgerungen können aus den Ergebnissen aus drei verschiedenen Messmethoden gezogen werden (elektrochemische Impedanzspektroskopie, Infrarotspektroskopie, Rasterkraftmikroskopie). Dieser wichtige Aspekt der verdünnten Ankerregion wurde in früheren Untersuchungen (Ataka et al. [14]) noch nicht berücksichtigt und stellt einen erheblichen Beitrag zur Optimierung des ptBLM-Systems dar.

9.4 Optimierung des Aufbaus der Protein-verankerten Lipidmembran mit der Cytochrom c Oxidase

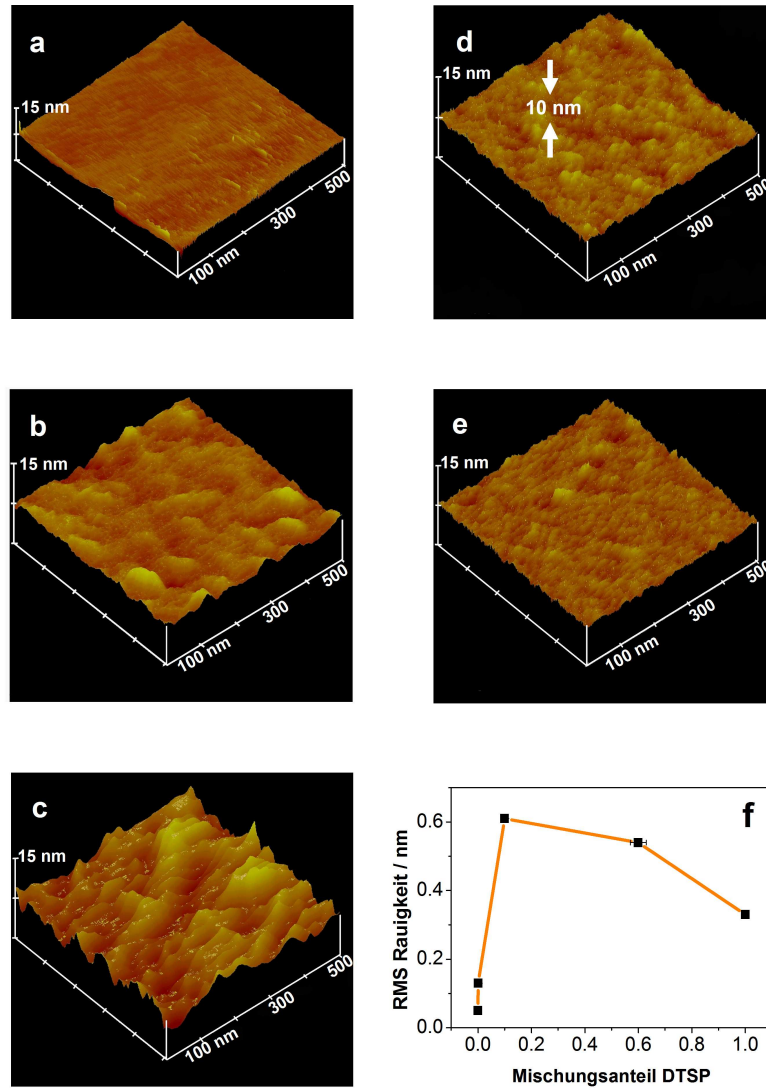


Abbildung 9.4.8: AFM-Aufnahmen (Tapping Mode) von TSG-Gold (a) und von CcO, die an die gemischte NTA-Schicht gebunden ist. Die Mischungsanteile DTSP/(DTSP+DTP) sind (b) 0,001, (c) 0,1, (d) 0,6 and (e) 1,0.

9.5 Systematischer Aufbau der Protein-verankerten Lipidmembran und Charakterisierung mit verschiedenen Methoden

Der Aufbau des ptBLM-Systems (ptBLM- protein-tethered bilayer lipid membrane, Protein-verankerte Lipidmembran) erfolgt in fünf aufeinander folgenden Schritten. Es ist wichtig, die einzelnen Schritte „live“ verfolgen zu können, um beurteilen zu können, wie gut die Präparation einer Probe gelungen ist. In dieser Arbeit werden mehrere Techniken benutzt, um dies zu gewährleisten. Sie wurden im letzten Abschnitt bereits eingesetzt, um das System zu optimieren und dienen darüber hinaus der standardmäßigen Analyse jeder Präparation:

Mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR, surface plasmon resonance) kann die Schichtdickenzunahme verfolgt werden. Die elektrische Impedanzspektroskopie (EIS) wird eingesetzt, um die Qualität der Membran hinsichtlich ihrer isolierenden Eigenschaft beurteilen zu können, auch im Vergleich zur Vermessung der Schicht nach dem Protein-Anbindungsschritt. Schließlich ist die oberflächenverstärkte ATR-FTIR-Spektroskopie eine besonders aussagekräftige Meßmethode, da mit ihr Aussagen über die anbindenden Molekülgruppen selbst gemacht werden können. Eine besondere Stärke unserer Arbeitsgruppe besteht darin, diese Methoden kombiniert einsetzen zu können. So sind sowohl die SPR- als auch die ATR-Zelle so konzipiert, dass mit demselben Setup EIS-Messungen durchgeführt werden können. Es kommt vor, dass eine elektrochemische Goldpräparation so schlecht gelungen ist, dass es keine geschlossene Membran gibt und keine elektrochemischen Messungen möglich sind. Es kann dann aber durchaus sein, dass spektroskopisch noch Informationen über die Probe ermittelt werden können. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse dieser verschiedenen Messungen dargestellt. In [14] wurden bereits ATR-FTIR-Messungen vom Aufbau des ptBLM-Systems der CcO gezeigt, in dieser Doktorarbeit können aber aufgrund des optimierten Setups wesentlich bessere Ergebnisse hinsichtlich Genauigkeit, Anzahl charakteristischer Banden und SNR gezeigt werden. In diesem Unterabschnitt werden zunächst die verschiedenen Schritte des Schichtaufbaus mit oberflächenverstärkter Infrarotspektroskopie analysiert. Anschließend folgt eine Untersuchung des Systems mit Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie, schließlich eine elektrische Charakterisierung mittels elektrischer

9.5 Systematischer Aufbau der Protein-verankerten Lipidmembran und Charakterisierung mit verschiedenen Methoden

Impedanzspektroskopie.

Der erste Schritt beim Aufbau des ptBLM-Systems ist die Funktionalisierung der Goldoberfläche mit dem hetero-bifunktionalen Cross-Linker Dithio-bis-(Succinimidyl-Propionat) (DTSP), welcher eine Thiolatbindung mit der Goldoberfläche eingeht. Zur Einstellung der optimalen Proteinkonzentration wird das DTSP mit DTP-Molekülen verdünnt (s. Abschnitt 9.4). Die Funktionalisierung der Goldoberfläche mit DTSP findet ex situ statt, da das Lösungsmittel DMSO weder in einer Plexiglaszelle verwendet werden kann (DMSO greift Plexiglas an) noch in einer Teflonzelle (DMSO wird von Teflon absorbiert, was die Zelle unbrauchbar für weitere Experimente macht). Die Funktionalisierung mit Sulfidgruppen auf Gold läuft erfahrungsgemäß sehr zuverlässig ab [14], weswegen im Rahmen dieser Arbeit nicht in einen entsprechenden speziellen Aufbau -z.B. aus Glas- investiert wurde.

Das ptBLM-System wurde mit dem Protein Cytochrom c Oxidase entwickelt, mit diesem Protein wird es auch in den folgenden Abschnitten präsentiert [14] [13]. Anschließend wird am Beispiel des bakteriellen photosynthetischen Reaktionszentrums gezeigt, dass das System auch auf andere Proteine anwendbar ist (Abschnitt 9.7).

9.5.1 Verfolgung des Schichtaufbaus des optimierten ptBLM-Systems mit Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie

Mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR, surface plasmon resonance, Abschnitt 6.1) kann die Schichtdickenänderung des Systems verfolgt werden. Die Experimente werden auf ultraglattem TSG-Gold durchgeführt und in einer Zelle, in der gleichzeitig die elektrischen Eigenschaften der Schicht vermessen werden können.

Zunächst wird eine Reflektivitätsmessung der mit der TP-NTA-Ni-Schicht funktionalisierten Oberfläche (s. Abbildung 9.5.1, kleines Bild, grüne Kurve, Punkt A in der blauen Kinetik-Kurve) in Abhängigkeit vom Laser-Einfallswinkel durchgeführt. Danach wird ein fester Winkel in der negativen Flanke des Plasmons eingestellt (55°) und die Änderung der Reflektivität während der Protein-Anbindung und der Membran-Rekonstitution aufgezeichnet (blaue Kurve in Abbildung 9.5.1).

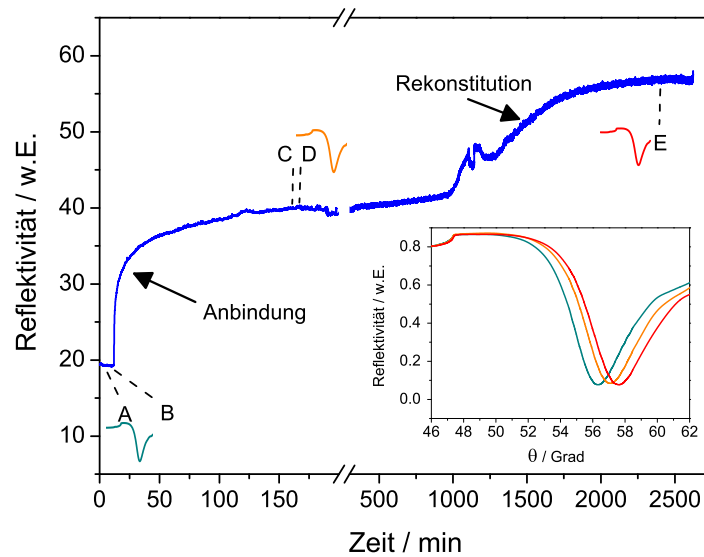


Abbildung 9.5.1: Kinetikmessung der CcO-Anbindung und der Membran-Rekonstitution (blaue Kurve) und winkelabhängige Absorptionskurven (kleines Bild). Die verschiedenen Schritte des Experimentes sind im Text erläutert.

Bei Punkt B wird die Proteinlösung auf die Oberfläche gegeben, woraufhin sofort der Anbindungsprozess beginnt. Die Protein-Anbindung ist nach etwa 90 Minuten abgeschlossen. Bei Punkt C wird mit DDM gespült und anschließend eine weitere winkelabhängige Reflektivitätsmessung durchgeführt (orange-farbene Plasmonenkurve, Punkt D). Nach dieser Messung wird wieder der für die Kinetikmessung ausgewählte Winkel eingestellt und die Kinetikmessung fortgesetzt. Die DDM-Lösung wird durch Lipid-Lösung ersetzt und die Dialyse wird durch Zugabe von Biobeads gestartet. Es dauert etwa 12 Stunden, bis mit der Ausbildung der Membran ein weiterer Schichtdickenzuwachs einsetzt, welcher nach ca. weiteren 25 Stunden (ca. 1500 Minuten) abgeschlossen ist. Bei Punkt E wird erneut eine winkelabhängige Reflektivitätsmessung durchgeführt (rote Plasmonenkurve). Die Reflektivität wird über die Fresnel-Gleichungen in die optische Schichtdicke umgerechnet (Abschnitt 6.1). Dabei müssen die unterschiedlichen Schichten, die bei der Ausbildung des Plasmons eine Rolle spielen, berücksichtigt werden. Dies sind das Glasprisma, die aufgedampfte Goldschicht, die Spacer-

9.5 Systematischer Aufbau der Protein-verankerten Lipidmembran und Charakterisierung mit verschiedenen Methoden

bzw. Ankerregion, die Protein- bzw. Protein/Lipidschicht und die Pufferlösung. Alle diese Schichten fließen mit ihren unterschiedlichen optischen Eigenschaften in die Fresnel-Gleichungen ein. Das entstehende Plasmon kann mit dem Programm Winspall [141] simuliert werden. Das Programm ist in Anhang A.1.2 erläutert. Mit Hilfe der Simulation kann die effektive Schichtdicke während des Aufbaus des ptBLM-Systems bestimmt werden.

	gemessen	theoretisch
d (Spacerregion) / nm	2,4	1,4
d (Protein) / nm	8,7	9
d (Protein+Membran) / nm	9,6	9

Tabelle 9.5.1: Durch Simulation der gemessenen SPR-Kurven erhaltene Schichtdicken für die Ankerregion, die CcO-Schicht und die CcO-Membran-Schicht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 9.5.1 eingetragen. Die effektive Schichtdicke der Spacerregion wird mit 2,4 nm simuliert und steigt mit der Protein-Anbindung auf ca. 11,1 nm. Die Schichtdicke von somit 8,7 nm entspricht in etwa dem, was man für einen Cco-Layer mit der Höhe eines Protein-Moleküls (in unserer definierten Orientierung) von 9 nm erwarten könnte. Die Höhe eines CcO-Moleküls wurde in [36] mittels Kristallstrukturanalyse bestimmt. Nach Ausbildung der Membran beträgt die effektive Schichtdicke ca. 12 nm, die Membran trägt demnach zu einer Zunahme der effektiven Schichtdicke von noch einmal ca. 0,9 nm bei. Die Schichtdicke der verankerten Proteine mit rekonstituierter Membran beträgt 9,6 nm, dieser Wert liegt leicht über der Höhe der Protein-Moleküle. Der Grund, warum die Membran nur einen geringen Einfluss auf die Schichtdicke hat, liegt darin, dass die Protein-Moleküle bereits eine geschlossene Schicht bilden. Während der Rekonstitution gelangen zwar Lipid-Moleküle zwischen die Proteine und stabilisieren die Proteinschicht, der Protein-Anteil in dieser Schicht liegt aber über 90% [15]. Der Wert 9,6 nm ist etwas zu hoch simuliert, zumal der Membran-Anteil in der Schicht zu einer effektiven Dicke von unter 9 nm beitragen sollte, da die Membran eine Dicke von etwa 5nm hat. Der Grund hierfür liegt in der Unsicherheit, mit der der Wert von 1,5 für den Brechungsindex der Cytochrom c Oxidase behaftet ist. Der Brechungsindex für CcO ist nicht bekannt und kann nur appro-

ximiert werden. [11] folgend wird für das Protein ein Wert von 1,45 und für die gemischte Protein/Membran-Schicht ein gemittelter Wert von 1,5 benutzt ³.

9.5.2 Verfolgung des Schichtaufbaus mit ATR-FTIR-Spektroskopie

9.5.2.1 ANTA-Kopplung und Ni-Komplexierung

Nach der Funktionalisierung der Goldoberfläche mit TSP wird eine Lösung von ANTA (Amino-Nitrilotriessigsäure, andere Bezeichnung: $N_{\alpha'}$, $N_{\alpha''}$ -bis(carboxymethyl)-L-Lysin) auf die Oberfläche gegeben. Der Succinimidylester-Rest des TSP reagiert mit der Amino-Gruppe des ANTA. Nach dieser Reaktion liegt eine NTA-Oberfläche vor, die im dritten Schritt Ni^{2+} -Ionen ligiert. Die experimentellen Details sind in Abschnitt 7.3 erläutert. IR-Spektren der ANTA-Kopplung für den Bereich 1600- 1300 cm^{-1} sind in Abbildung 9.5.2 dargestellt. Für jede Messung werden Scans über eine Stunde aufakkumuliert.

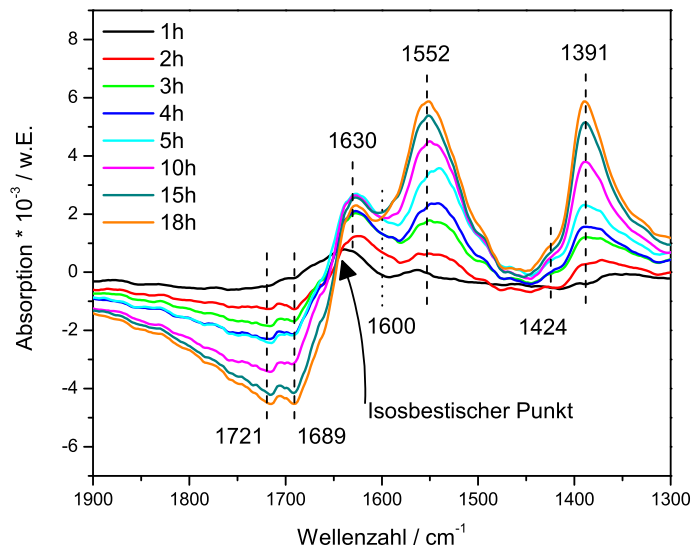
Mehrere Banden können zugeordnet werden: Im Bereich der Wellenzahlen oberhalb des isosbestischen Punktes zeigen die negativen Banden Schwingungen des Reaktanden auf der Oberfläche (TSP), während positive Banden von der Produktspezies (NTA) stammen. Die Existenz des isosbestischen Punktes liefert einen wichtigen Hinweis darauf, dass die Austauschreaktion sauber und unverfälscht abläuft [144]. Die Banden bei 1721 und 1693 cm^{-1} können den C=O-Schwingungen im Succinimidylring zugeordnet werden, welcher in Lösung geht und die daher negativ sind. Die positiven Banden bei 1630 und bei 1552 cm^{-1} werden der Amid-I- (C=O-Streckschwingung) und der Amid-II-Bande (C=N-Streckschwingung gekoppelt mit der N-H-Biegeschwingung) der Carboxamidgruppe (CONH) zugeordnet [145]. Der Nachweis dieser vier Banden zeigt eindeutig die Kopplung zwischen dem ANTA und dem TSP.

Nach [145] wären auch Banden im Bereich von 1600 cm^{-1} zu erwarten. Diese Banden können jedoch wegen des Überlapps mit den Amid-Banden nicht aufgelöst werden, sind aber andeutungsweise im Spektrum zu erkennen (gepunktet markiert).

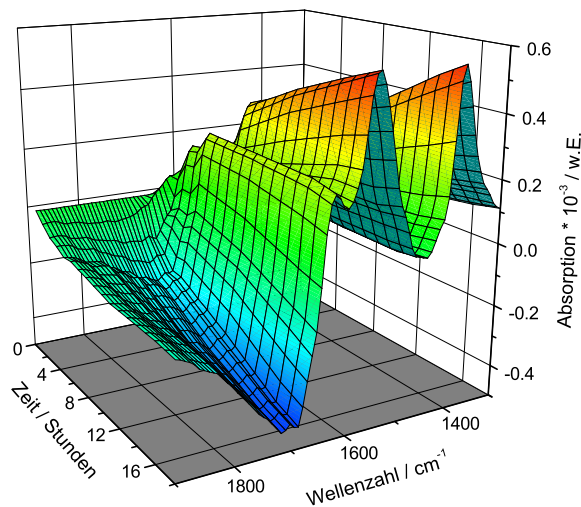
Die Banden bei 1424 cm^{-1} und bei 1391 cm^{-1} werden den symmetrischen Carboxyl-

³Für Phosphatidylcholin in einer freischwebenden Membran wird in [142] ein Wert von $n = 1,56$ und in [143] ein Wert von 1,66 angegeben.

9.5 Systematischer Aufbau der Protein-verankerten Lipidmembran und Charakterisierung mit verschiedenen Methoden



(a)



(b)

Abbildung 9.5.2: (a) FTIR-Spektren der Kopplung von ANTA mit dem TSP-Monolayer. Die negativen Banden können Schwingungen im Succinimidyl-Ring zugeordnet werden, der während der Reaktion in Lösung geht. Die positiven Banden können unterschiedlichen Schwingungen im ANTA-Molekül zugeordnet werden (s. Text); (b) 3-dimensionale Veranschaulichung.

ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung des Aufbaus von verankerten Lipid-Membranen (tBLMs und ptBLMs)

Streckschwingungen der NTA-Carboxylgruppen des NTA zugeordnet. Weitere zugehörige Banden, die Dichtefunktionaltheorie-Rechnungen liefern (s. [14]), können nicht isoliert werden. Eine stärkere Ausprägung der symmetrischen Carboxylat-Schwingungen wird durch die starke Kopplung zur C–H-Biegeschwingung und zur C–N-Streckschwingung behindert.

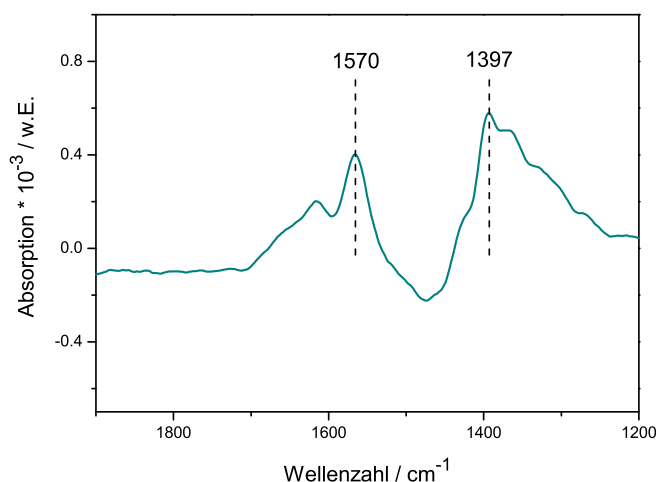


Abbildung 9.5.3: Änderung der Schwingungsanregung des NTA durch die Komplexierung von Ni^{2+} . Das Referenzspektrum wurde vor der Zugabe von 50mM $NiSO_4$ aufgenommen. Gezeigt ist ein Spektrum 15 Minuten nach der Zugabe, hier ist die Komplexierung bereits abgeschlossen.

In Abbildung 9.5.3 ist das Differenzspektrum der TP-NTA-Ni-Schicht 15 Minuten nach der Zugabe von 50mM $NiSO_4$ dargestellt, Referenz ist die Schicht vor $NiSO_4$ -Zugabe. Das Signal ist erwartungsgemäß deutlich (etwa eine Größenordnung) kleiner als das der ANTA-Kopplung, es sind aber dennoch zwei deutliche Banden bei 1570 und 1397 cm^{-1} zuzuordnen. Sie gehören zu Absorptionsänderungen der asymmetrischen und der symmetrischen Streckschwingung der terminalen Carboxylatgruppen des NTA, welche während der Komplexierung des Ni^{2+} -Ions deprotoniert werden. Auf eine Serie von Differenzspektren während der Ni-Komplexierung muss verzichtet werden, da aufgrund des schwachen Signals dafür nicht genug Signal aufakkumuliert werden kann. Im hier gezeigten

9.5 Systematischer Aufbau der Protein-verankerten Lipidmembran und Charakterisierung mit verschiedenen Methoden

Spektrum wurden Scans über 10 Minuten addiert, die Ni-Komplexierung ist aber bereits nach 15 Minuten abgeschlossen.

Vergleich der Absorptionsspektren mit den in [14] (Ataka et al.) aufgenommenen Spektren Die hier aufgenommenen Spektren der ANTA-Kopplung sind vergleichbar mit den in [14] gezeigten Spektren. Das Signal bewegt sich in derselben Größenordnung, in vorliegender Arbeit werden etwa 6 mAE (milliAbsorptionseinheiten) gemessen, in [14] sind es etwa 10 mAE. Dies ist durch die Verdünnung der Spacerregion zu erklären und wird auch in Abbildung 9.4.4 im direkten Vergleich gezeigt. Der Unterschied ist dort nicht so deutlich, dies liegt aber an der bedingten Reproduzierbarkeit eines einzelnen Experimentes. In [14] können zwei weitere Banden bei 1808 und 1781 cm^{-1} Schwingungen des Succinimidylesters zugeordnet werden, die hier nicht aufgelöst werden können. Die gleiche Größenordnung der negativen Peaks der Spezies, die in Lösung gehen, und der Spezies, die adsorbiert werden (und die klare Separation durch den isosbestischen Punkt) weist auf eine sauber ablaufende Austauschreaktion in vorliegender Arbeit hin, was in [14] so nicht zu beobachten ist. Im Gegensatz zu den Messungen in [14] ist hier die Amid-II-Bande stärker ausgeprägt als die Amid-I-Bande. Eine Erklärung hierfür kann nicht gegeben werden, wobei die Spektrenform ist jedoch sehr gut reproduzierbar und in vielen Versuchen so gemessen wurde. Die Kinetik der Kopplungsreaktion schließlich ist in Abschnitt 9.4.4 für eine Kopplung auf einer unverdünnten TSP-Schicht und einer verdünnten Schicht miteinander verglichen. In [14] ist keine Zeitkonstante angegeben, sie liegt etwa in der Größenordnung $\tau \approx 1$ h. Dies zeigt eine schnellere Kopplung als in vorliegender Arbeit, wo für die unverdünnte Schicht $\tau = 5,7$ h und für die verdünnte Schicht $\tau = 4,4$ h ermittelt wurde. Für diese Diskrepanz kann ebenfalls keine Erklärung gegeben werden, aber auf die gute Reproduzierbarkeit auch dieser Werte verwiesen werden. Die Absorptionsänderungen durch die Ni^{2+} -Komplexierung sind an denselben beiden Banden zu beobachten, wobei die hier gezeigte Messung wesentlich rauschärmer ist, die Stärke der Änderung aber ähnlich groß ist.

9.5.2.2 Anbindung der Cytochrom c Oxidase

Nach Aktivierung der Goldoberfläche wird im Detergens Dodecylmaltosid (DDM) 100nM gelöste Cytochrom c Oxidase auf die Ni-NTA-Schicht adsorbiert. Dies ge-

ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung des Aufbaus von verankerten Lipid-Membranen (tBLMs und ptBLMs)

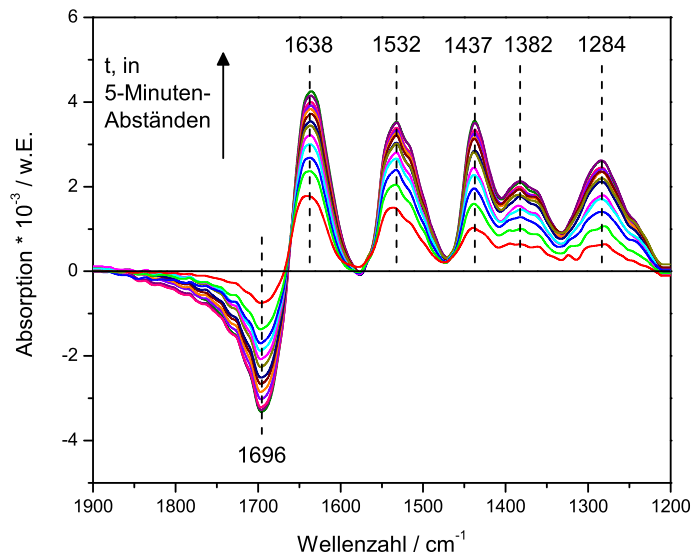
schieht durch die Affinität des His-Tags zur Ni-NTA-Schicht (s. Abschnitt 3.5). Für die Aufnahme der CcO-Anbindung wird zunächst ein Referenzspektrum in DDM-Detergens aufgenommen. Danach wird CcO in einer definierten Konzentration in die Lösung gegeben, so dass die endgültige CcO-Konzentration 100 nMol beträgt.

Die im Folgenden aufgeführten Amid-Banden sind nach [20] und [134] zugeordnet worden. In den Abbildungen 9.5.4 und 9.5.5 sind die IR-Differenzspektren bis zu 65 Minuten nach Beginn des Anbindungsprozesses abgebildet, wobei sich die Amid-Markerbanden hauptsächlich in dem Bereich befinden, welcher in Abbildung 9.5.4 dargestellt ist, nämlich zwischen 1200 und 1900 Wellenzahlen. Es sind etliche deutlich ausgeprägte positive Banden in diesem Bereich zu identifizieren: bei 1638, 1532, 1437, 1382 und 1284 cm^{-1} . Eine ebenso deutliche negative Bande liegt bei 1696 cm^{-1} . Zwischen den positiven und der negativen Bande laufen alle Differenzspektren durch den isosbestischen Punkt [144]. Die Bande bei 1638 cm^{-1} wird der Amid-I-Mode, die Bande bei 1532 cm^{-1} der Amid-II-Mode der Polypeptid-Gerüst-Schwingungen der CcO zugeordnet. Die Amid-I-Bande umfasst dabei hauptsächlich die CO-Streckschwingungsmode, aber auch Anteile von CN- und CCN-Schwingungen. Die Amid-II-Bande umfasst hauptsächlich NH- und CN-Schwingungsmoden. Näheres zu den Amid-Schwingungen ist in Abschnitt 4.1.4 erläutert. Die Bande bei 1284 cm^{-1} wird der Amid-III-Mode zugeordnet, die wie die Amid-II-Bande größtenteils die NH-in-plane-Biegeschwingung beinhaltet.

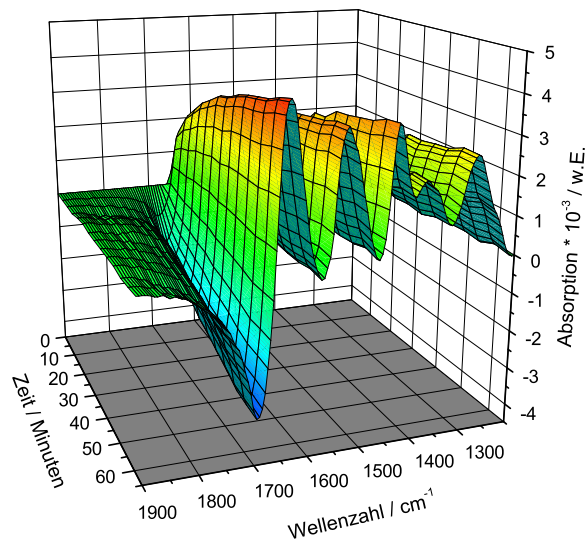
Sekundärstrukturtyp	$\tilde{\nu}(\text{Amid I}) / cm^{-1}$	$\tilde{\nu}(\text{Amid II}) / cm^{-1}$	$\tilde{\nu}(\text{Amid III}) / cm^{-1}$
α -Helix	1648-1655	1545-1550	1260-1290
β -paralleles + β -antiparalleles Faltblatt	1630-1636	1520-1530	1235
Gemessen für CcO	1638	1532	1284

Tabelle 9.5.2: Zuordnung von Wellenzahlen der Amid I-, II- und III-Bande zu Sekundärstrukturen von Proteinen (Auszug aus Tabelle 4.1.4) und Vergleich mit den für die CcO gemessenen Werten.

9.5 Systematischer Aufbau der Protein-verankerten Lipidmembran und Charakterisierung mit verschiedenen Methoden



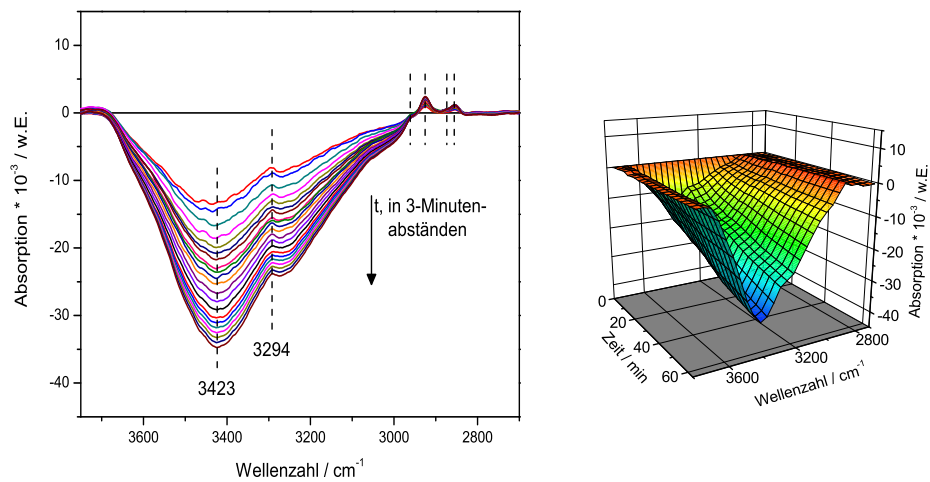
(a)



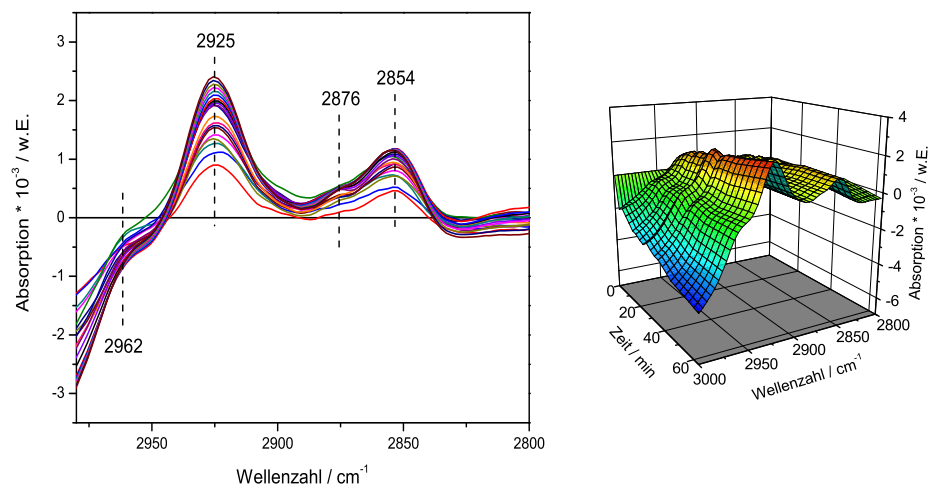
(b)

Abbildung 9.5.4: (a) FTIR-Spektren der Anbindung von CcO an die TP-NTA-Ni-Gruppe. Abgebildet ist der Amid-Bereich. Neben den drei Amidbanden (Amid I, II und III) sind Banden zu sehen, die durch die Komplexbildung hervorgerufene Konformationsänderungen in der NTA-Gruppe zeigen; (b) 3D-Ansicht.

ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung des Aufbaus von verankerten Lipid-Membranen (tBLMs und ptBLMs)



(a)



(b)

Abbildung 9.5.5: FTIR-Spektren der Anbindung von CcO an die TP-NTA-Ni-Gruppe: (a) OH-Bereich; (b) Methyl-Bereich (Ausschnitt aus (a))

9.5 Systematischer Aufbau der Protein-verankerten Lipidmembran und Charakterisierung mit verschiedenen Methoden

Die Peak-Positionen der Amid-Banden an diesen Stelle sind charakteristisch für ein Protein, das wie die CcO aus α -Helices und aus β -Faltblättern besteht (s. Tabelle 4.1.4). Der Wert für die Amid I-Bande liegt zwischen dem Wellenzahlbereich für die α -Helix und für parallele bzw. antiparallele β -Faltblätter. Ebenso liegt der Wert für die Amid II-Bande zwischen den beiden Bereichen. Der Wert für die Amid III-Bande fällt genau in den Bereich für die α -Helix. Die Werte sind den Literaturwerten in Tabelle 9.5.2 gegenübergestellt. Der Anstieg der Absorptionsintensitäten mit der Zeit zeigt eindrucksvoll die Anbindung des Proteins an die Ni-NTA-Oberfläche. Der Beitrag des Proteins in Lösung ist vernachlässigbar, da zum einen die Konzentration mit 100nM sehr niedrig ist und zum anderen nur Oberflächen-gebundenes Protein mit dem Oberflächen-Verstärkungseffekt detektiert wird. Der effektive Abstand, bis zu dem der Effekt wirkt, beträgt weniger als 10nm [146] und erfasst somit nur die angebundene Schicht samt Proteinen (und später der Membran). Die positiven Banden bei 1437, 1382 cm^{-1} und auch die negative Bande bei 1696 cm^{-1} werden Prozessen im ANTA-Ni-Layer zugeordnet. Im Speziellen kann die Bande bei 1437 cm^{-1} der symmetrischen Streckschwingung der NTA-Carboxylatgruppe zugeordnet werden, die das Ni^{2+} -Ion komplexiert. Die negative Bande bei 1696 cm^{-1} gehört zu einer Mode der symmetrischen $C=O$ -Schwingung der Carboxylatgruppen. Durch die Anbindung des Proteins und den damit verbundenen Konformationsänderungen erfolgt demnach eine Verschiebung der Anteile von $C=O$ -Schwingungsmoden hin zu einem größeren Anteil von Carboxylat-Streckschwingungsmoden.

In Abbildung 9.5.5 ist oben die Absorption im Bereich der OH-Bande (3423 cm^{-1}) dargestellt.

Die negative OH-Bande zeigt die Verdrängung von Wasser durch Protein. In den breiten OH-Peak ist die Amid-A-Bande als positive Bande (3294 cm^{-1}) eingelagert. Diese Bande stammt von der NH-Streckschwingung des Polypeptid-Gerüsts. Im Bereich von 2800-3000 cm^{-1} sind Banden von Methylschwingungen zu sehen. Sie stammen von den vielen Kohlenwasserstoffbindungen im Protein und zeigen somit ebenfalls eine Anlagerung des Proteins an. Dieser Bereich ist in Abbildung 9.5.5 vergrößert dargestellt. Die Zuordnung der Methylbanden erfolgt nach [134] (s. Tabelle D.2.1). Die Bande bei 2962 cm^{-1} liegt in der Flanke der OH-Bande und ist vergleichsweise schwach ausgeprägt. Sie kann der asymmetrischen CH_3 -Streckschwingung zugeordnet werden. Die Bande bei 2926 cm^{-1} gehört zur

ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung des Aufbaus von verankerten Lipid-Membranen (tBLMs und ptBLMs)

asymmetrischen CH_2 -Streckschwingung, die schwache Bande bei 2875 cm^{-1} gehört zur symmetrischen CH_3 -Streckschwingung und die vierte Bande in diesem Bereich, bei 2854 cm^{-1} , stammt von der symmetrischen CH_2 -Streckschwingung. Für eine Analyse der Absorptionskinetik wird die Amid-II-Bande als repräsentativer Peak für die Anbindung analysiert. In Abbildung 9.5.6 ist die aufintegrierte Fläche der Amid-II-Bande in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Man findet einen Anstieg der Absorption, der nach ca. 40 Minuten in Sättigung geht. Ein monoexponentieller dreiparametrischer Fit der Form

$$x = a \cdot (1 - \exp(-t/\tau)) \quad (9.5.1)$$

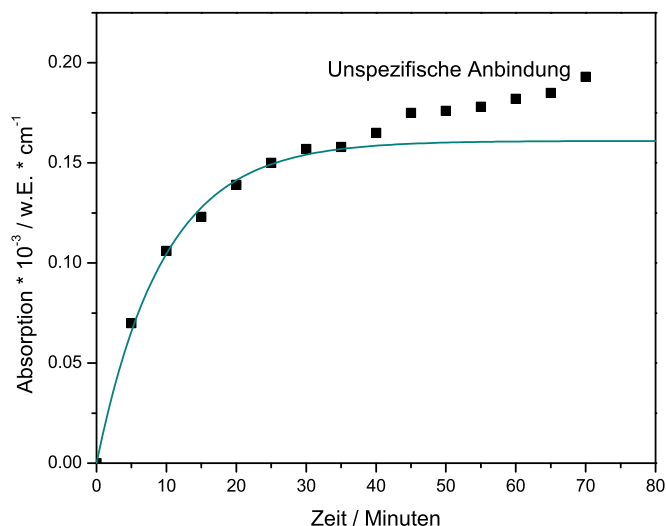


Abbildung 9.5.6: Adsorptionskinetik der CcO auf der NTA-Ni-Oberfläche. Die Fläche der Amid-II-Bande aus Abbildung 9.5.4 wird in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Zur Bestimmung der Zeitkonstanten wird eine Exponentialfunktion angefitet. Nach etwa 40 Minuten findet unspezifische Anbindung statt. Dies ist bei dem Fit zu berücksichtigen. Die ermittelte Zeitkonstante für die Anbindung beträgt $\tau = 571\text{ s}$ bzw. 9 min 31 s.

liefert die Zeitkonstante $\tau = 571\text{ s}$ bzw. 9 min 31 s. Nach etwa 40 Minuten ist der Anbindungsprozess weitgehend abgeschlossen und es findet eine unspezifische Anbindung statt. Dieses Verhalten wurde in zahlreichen Experimenten unter glei-

9.5 Systematischer Aufbau der Protein-verankerten Lipidmembran und Charakterisierung mit verschiedenen Methoden

chen Bedingungen bestätigt.

Vergleich der Absorptionsspektren mit den in [14] (Ataka et al.) aufgenommenen Spektren Die in vorliegender Arbeit gezeigten Spektren der Anbindung des Proteins sind hinsichtlich des SNR deutlich besser als die Spektren in [14]. Insbesondere die Banden bei 1437 und 1382 cm^{-1} (Konformationsänderungen im NTA-Spacer) und 1284 cm^{-1} (Amid III) sind in [14] sehr verrauscht und schlecht aufgelöst. Die negative Bande bei 1696 cm^{-1} (NTA-Spacer) in vorliegender Arbeit kann in [14] nicht nachgewiesen werden. Die Banden im Bereich der OH- und der Methyl-Absorption werden in [14] nicht gezeigt. Die Signalstärke ist ähnlich hoch und liegt bei 4 mAE.

Das generell wesentlich bessere SNR der Absorptionsspektren ist durch die schwächere elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Proteinen aufgrund der Verdünnung zu erklären.

Die Anbindungskinetik liegt mit $\tau=9\text{ min } 31\text{ s}$ in derselben Größenordnung wie in [14].

9.5.2.3 Rekonstitution der oberflächenverankerten CcO in eine Lipid-Membran

Im nächsten und letzten Schritt der Präparation wird um die angebondenen Proteine eine Membran rekonstituiert. Dafür kommt eine neue Strategie zum Einsatz, die in Abschnitt 7.3.2 im Detail erläutert wird. An dieser Stelle sei nur daran erinnert, dass eine Lösung von DDM-solubilisierten Mizellen des Lipids 1,2-Diphytanyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DPhyPC) in die Messzelle gegeben wird. Biobeads absorbieren dann das Detergens, so dass das Lipid allmählich freigegeben wird. Im Laufe dieser in-situ-Dialyse lagert sich das Lipid spontan um die Proteine herum an und bildet die Protein-verankerte Lipid-Membran. Das die Proteine schützende Detergens wird im Verlauf dieses Prozesses ebenfalls sukzessiv von den Biobeads absorbiert. In [13] wurde für das gleiche System eine Dialyse mit einer Dialysemembran realisiert.

Für die IR-Messungen wird ein Referenzspektrum direkt nach Beginn der Dialyse aufgenommen. Das ist deshalb problemlos möglich, weil es bis zum Überschreiten der kritischen Mizellenkonzentration (critical micelle formation concentration, cmc) und damit bis zum Beginn des Membranaufbaus mehrere Stunden dauert. Abbildung 9.5.7 zeigt das IR-Differenzspektrum nach Abschluss der Dialyse, 24 Stunden nach Zugabe der Biobeads. Die auftretenden Banden sind vergleichsweise schwach ausgeprägt, weswegen auf eine zeitabhängige Analyse während des Rekonstitutionsprozesses verzichtet wird.

Die Inkorporation von DPhyPC wird deutlich durch die auftretenden Methyl-Banden gezeigt. Im Bereich zwischen 3000 und 2800 cm^{-1} liegen die symmetrischen und asymmetrischen CH_2 und CH_3 -Moden, wie bereits in Abschnitt 9.5.2.2 diskutiert wird.

9.5 Systematischer Aufbau der Protein-verankerten Lipidmembran und Charakterisierung mit verschiedenen Methoden

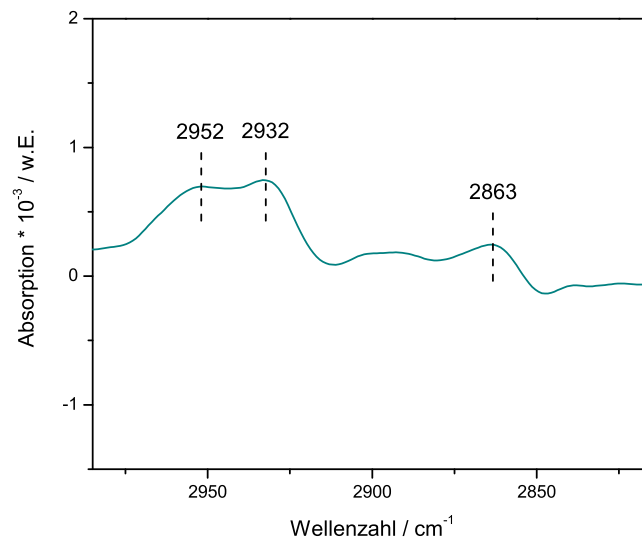


Abbildung 9.5.7: FTIR-Differenzspektrum nach Abschluss der Dialyse. Die auftretenden Methylbanden zeigen die Anlagerung des Lipids DPhyPC.

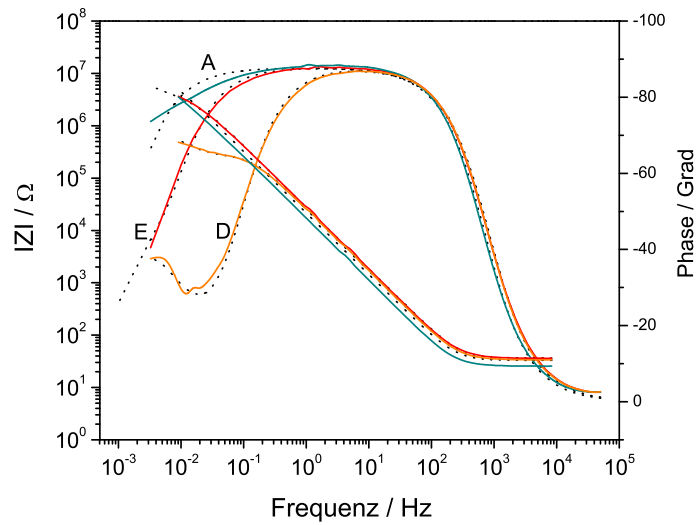
9.5.3 Verfolgung des Schichtaufbaus mit elektrischer Impedanzspektroskopie

Die Charakterisierung der verschiedenen Schichten beim ptBLM-Aufbau mittels elektrischer Impedanzspektroskopie (EIS) lässt Aussagen über die Qualität insbesondere der Membran hinsichtlich ihrer isolierenden Eigenschaft zu. Bei einer hohen Impedanz ist die Membran homogen und es gibt kaum Defekte. Dadurch lässt sich auch auf eine geordnete Anordnung der Protein-Moleküle schließen. Als „hoch“ sei hier ein grober Richtwert der Impedanz der Protein-Membran-Schicht von $R \geq 1M\Omega \cdot cm^2$ für TSG-Gold gegeben, mit den besten Präparationen konnten Werte von $7,5M\Omega \cdot cm^2$ erreicht werden. Gleichzeitig ist eine homogene Membran durch eine niedrige Kapazität charakterisiert. Hier werden für eine gute Präparation Werte von $C \leq 10\mu F/cm^2$ erreicht, das Optimum liegt bei $6,8\mu F/cm^2$. Mit der aufgerauten Goldschicht für die oberflächenverstärkten FTIR-Experimente werden schlechtere Werte erzielt, da sich aufgrund der rauen Oberfläche eine vergleichsweise inhomogenere Schicht ausbildet.

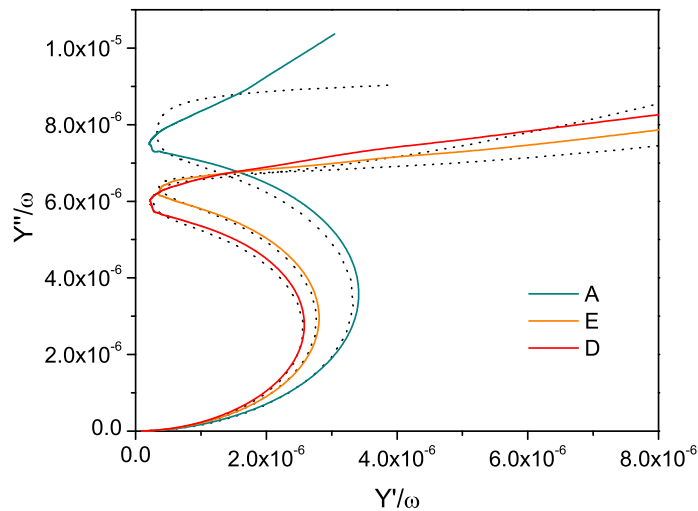
In Abbildung 9.5.8 sind Bode-Plot und frequenzreduzierter Admittanzplot einer Präparation dargestellt. Die Daten wurden mit den in Abbildung 9.5.9 dargestellten Äquivalenzschaltbildern angefügt. Ein wichtiges Indiz, um mit Hilfe der EIS-Ergebnisse eine Aussage über die Güte einer Präparation machen zu können, ist der Vergleich des Widerstandes und der Kapazität vor und nach der Membran-Rekonstitution. Als Ergebnis des Fits ergibt sich für das dargestellte Experiment für die Impedanz der TP-NTA-Ni-Schicht ein Wert von $13,63 \pm 0,96 M\Omega$. Nach der Protein-Anbindung hat die Schicht eine deutlich niedrigere Impedanz, wobei für die TP-NTA-Ni-Schicht $236,3 \pm 3,5 k\Omega$ und für die Protein-Schicht ein Wert von $1,23 \pm 0,16 M\Omega$ ermittelt werden. Nach der Rekonstitution liegt der Wert für die submembrane TP-NTA-Ni-Schicht bei $1,96 \pm 0,18 M\Omega$ und für die Protein-Membran-Schicht bei $5,05 \pm 0,25 M\Omega$.

Der starke Einbruch der Impedanz der Sub-Protein-Schicht lässt sich dadurch erklären, dass die Spacer-Gruppen durch die Thiolat-Bindungen des Thio-Propionats eine sehr stabile und geordnete Schicht mit einer vergleichsweise hohen Impedanz ausbilden. Durch die Anbindung des Proteins wird diese Ordnung gestört. Die CcO-Moleküle binden ungeordnet und nur an einen Teil der Anker-Gruppen an. Zudem werden sie zunächst noch nicht durch eine Membran stabilisiert. Nach der Rekonstitution sind die Proteine in der Membran eingebettet, was einen stabilisie-

9.5 Systematischer Aufbau der Protein-verankerten Lipidmembran und Charakterisierung mit verschiedenen Methoden



(a)



(b)

Abbildung 9.5.8: Elektrische Impedanzspektren der reinen TP-NTA-Ni-Schicht (A), der Schicht nach CcO-Anbindung (D) und der fertigen Schicht nach Membran-Rekonstitution (E). (a) Bode-Plot; (b) Frequenzreduzierter Admittanzplot. Gepunktet sind die angefitzten Kurven eingezeichnet. Die Beschriftung der Präparati-onsschritte mit A, D und E soll -Abbildung 9.5.1 folgend- einer guten Übersicht dienen.

ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung des Aufbaus von verankerten Lipid-Membranen (tBLMs und ptBLMs)

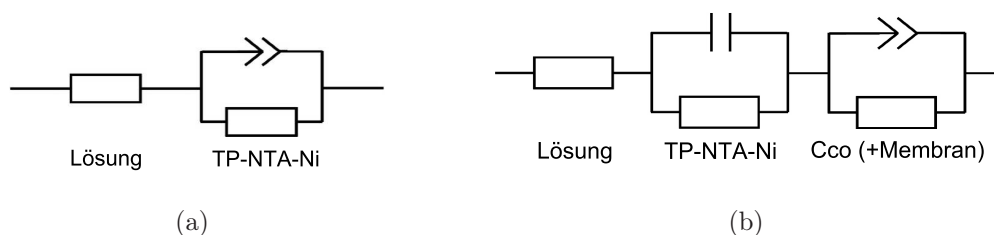


Abbildung 9.5.9: Äquivalenzschaltbilder für die Fits der Messkurven in Abbildung 9.5.8; (a) Schaltbild für die Fits vor der Protein-Anbindung; (b) Schaltbild für die Fits nach der Protein-Anbindung und nach der Rekonstitution. Details s. Abschnitt 5.1.5

renden Effekt hat. Der Haupteffekt für die steigende Impedanz ist die isolierende Eigenschaft der Membran. Die Impedanz der Protein-Membran-Schicht steigt so von ca. 1,2 auf ca. 5 M Ω . Sowohl die stabilisierende und ordnende Wirkung der Membran auf die Protein-Moleküle als auch die isolierende Wirkung der Membran sind für die Herstellung der Funktionalität des Proteins und somit für die angestrebten Experimente zu den Redox-Prozessen im Protein von entscheidender Bedeutung. Es sei daher nochmals darauf hingewiesen, dass das eigentliche Interesse dem Verhalten der Impedanz durch die Membran-Rekonstitution gilt.

Mit der Kapazität verhält es sich -was die Zahlenwerte anbelangt- genau umgekehrt: sie liegt für die Thiolat-gebundene Spacergruppe bei $6,1 \pm 0,1 \mu F$ ⁴. Dieser Wert steigt nach der Protein-Bindung leicht auf $7,6 \pm 0,07 \mu F$, die Proteinschicht selbst hat eine Kapazität von $13,6 \pm 1 \mu F$. Durch die Rekonstitution verringert sich dieser Wert auf $8,6 \pm 0,4 \mu F$. Die Kapazität der submembranen Schicht nach der Rekonstitution wird der Vollständigkeit wegen erwähnt: sie beträgt nach dem Fit $10,05 \pm 0,48 \mu F$. Die Werte für Widerstand und Kapazität der Schichten sind in Tabelle 9.5.3 zusammengefasst.

Die Kapazität der TP-NTA-Ni-Schicht verändert sich während der einzelnen Anbindungsschritte wenig. Sie steigt aber nach der Protein-Anbindung an, was durch

⁴Im Äquivalenzschaltbild für den Fit wird für die Kapazität der Spacer-Schicht vor der Anbindung sowie für die Protein- und die kombinierte Protein-Membran-Schicht ein constant phase element (CPE) eingesetzt. Dieses repräsentiert eine Verteilung von Kapazitäten um den angegebenen Wert herum, was für die betrachteten Schichten plausibel erscheint.

9.5 Systematischer Aufbau der Protein-verankerten Lipidmembran und Charakterisierung mit verschiedenen Methoden

	Kapazität / μF	Widerstand / $\text{M}\Omega$
Spacerregion	$6,1 \pm 0,1$	$13,6 \pm 1,0$
Protein	$13,6 \pm 1,0$	$1,2 \pm 0,2$
Protein+Membran	$8,6 \pm 0,4$	$5,0 \pm 0,3$

Tabelle 9.5.3: Mit elektrischer Impedanzspektroskopie gemessene Werte für Widerstand und Kapazität der Schichten des ptBLM-Systems.

die höhere Unordnung zu erklären ist. Die Kapazitätswerte der Protein- bzw. Protein-Membran-Schicht sind wie folgt zu erklären: die Kapazität einer dielektrischen Schicht wird durch ihre Dicke und ihre dielektrische Konstante ϵ bestimmt. Zwischen den angeordneten Protein-Molekülen in der Protein-Schicht ist Wasser eingelagert, welches eine Dielektrizitätskonstante von $\epsilon \approx 80$ hat [33]. Für Proteine gilt $\epsilon \approx 20\text{-}30$ [147], [148]. Sehr viel kleiner ist die Dielektrizitätskonstante des verwendeten Lipids mit $\epsilon \approx 2,2$ [13]. Mit der Formel für die Kapazität eines Plattenkondensators

$$C = \epsilon_0 \epsilon \cdot \frac{A}{d} \quad , \quad (9.5.2)$$

die als Approximation für dieses System zu gebrauchen ist, wird deutlich, dass das Lipid mit dem deutlich niedrigeren Wert für ϵ bei Ersetzen des Wassers in der Protein-Schicht zu einer sinkenden Kapazität führt.

Für reine tBLMs (tethered bilayer lipid membranes) erhält man Werte für die Impedanz von einigen $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}^2$ und für die Kapazität von $<0,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ [149]. Der hier gemessene Wert für eine Protein-Membran-Schicht von $8,6 \mu\text{F}$ kommt dem Wert für eine reine Protein-Schicht (Dicke 5nm und o.g. Werten für $\epsilon \approx 20\text{-}30$) von $6 \mu\text{F}$ nahe, weswegen von einer hohen Proteinbelegung ausgegangen werden kann. Sie wurde für das vorliegende biomimetische System in [15] mittels Messung des Ladungstransfers durch Cyclovoltammetrie zu $\geq 90\%$ bestimmt. Abschließend sei darauf hingewiesen, dass die Ergebnisse konsistent zu [13] sind.

Aktivierung der Cytochrom c Oxidase Untersuchungen zur Aktivierung der CcO in der bisher gezeigten Orientierung („Down-Konfiguration“) wurden in [17] durchgeführt. Die dabei durch elektrochemische Messungen gefundenen kinetischen Konstanten der Redoxzentren sind Ausgangspunkt für zeitaufgelöste

Infrarot-Messungen in vorliegender Arbeit (s. Abschnitt 10).

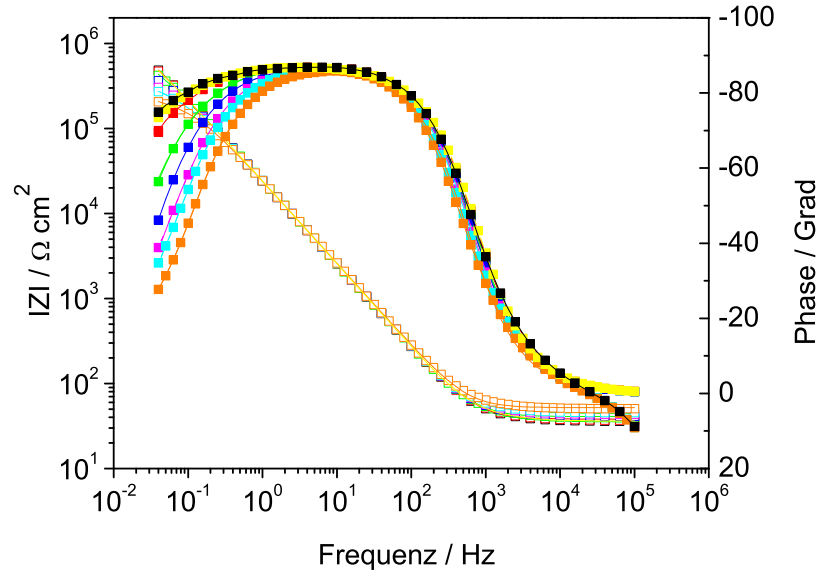
9.6 Untersuchungen der Funktionalität der Cytochrom c Oxidase in der inversen Orientierung mit dem optimierten ptBLM-System

In der ptBLM rekonstituierte CcO in der Up-Konfiguration, welche mit der Cytochrom c- Bindungsstelle zur Pufferlösung gerichtet ist, wird mit reduziertem Cyt c aktiviert. Spektren der elektrischen Impedanz werden als Funktion der Konzentration von reduziertem Cyt c aufgenommen. Das reduzierte Cyt c kann sein Elektron an die Cco abgeben. Das Experiment wird in Sauerstoff-gesättigter Pufferlösung durchgeführt, das angelegte Potential beträgt 200mV vs. NHE, dies entspricht 0mV vs. Ag|AgCl. Die EIS-Spektren sind in Abbildung 9.6.1 (a) gezeigt. Ein Anfitten der Kurven unter Benutzung des in Abbildung 9.5.9 (b) dargestellten Äquivalentschaltkreises liefert den Membranwiderstand, welcher als Funktion der vorliegenden Cyt c-Konzentration absinkt. Die Abhängigkeit kann näherungsweise durch einen exponentiellen Zusammenhang der Form $\propto e^{-a \cdot c}$ beschrieben werden (s. Abbildung 9.6.2 (b)).

Als Ergebnis des enzymatischen Turnovers werden Protonen durch die CcO aktiv vom submembranen Raum in die Pufferlösung transportiert. Die Translokation von Protonen lässt einen Ionenfluss über die Membran erwarten, wodurch der Widerstand abnimmt. Da mit einer höheren Cyt-c-Konzentration der enzymatische Ionentransport verstärkt wird, sinkt der Widerstand als Funktion steigender Cyt-c-Konzentration. Diese Erklärung eines Cyt-c-vermittelten enzymatischen Ionentransports wird durch die Beobachtung untermauert, dass die Widerstandsabnahme durch die Zugabe von Cyanid gestoppt werden kann [13]. CN^- bindet irreversibel an das zentrale Eisen(III)-Ion des Häm a_3 -Kofaktors in der CcO und blockiert somit die Sauerstoff-Bindungsstelle.

Der Protonentransport konnte an der CcO in der invertierten Orientierung direkt gezeigt werden. Dabei wurde die kathodische Reduktion der transportierten Protonen an der Elektroden-Oberfläche gemessen [15]. Abschließend sei bemerkt, dass die Widerstandsabnahme sehr sensitiv bzgl. der Qualität der rekonstituierten Membran ist.

9.6 Untersuchungen der Funktionalität der Cytochrom c Oxidase in der inversen Orientierung mit dem optimierten ptBLM-System



(a)

Farbe	Cyt-c-Konzentration / mol l ⁻¹
schwarz	0 (PBS)
gelb	$7,95 \cdot 10^{-5}$
rot	$2,29 \cdot 10^{-4}$
grün	$5,59 \cdot 10^{-4}$
blau	$8,37 \cdot 10^{-4}$
magenta	$1,07 \cdot 10^{-3}$
cyan	$1,28 \cdot 10^{-3}$
orange	$1,61 \cdot 10^{-3}$

(b)

Abbildung 9.6.1: (a) Impedanz-Spektren (Bode-Plot-Darstellung) der in die pt-BLM eingebetteten CcO als Funktion der Cyt-c-Konzentration bei einer angelegten Vorspannung von +200mV; (b) Zuordnung Farbe → Cyt-c-Konzentration

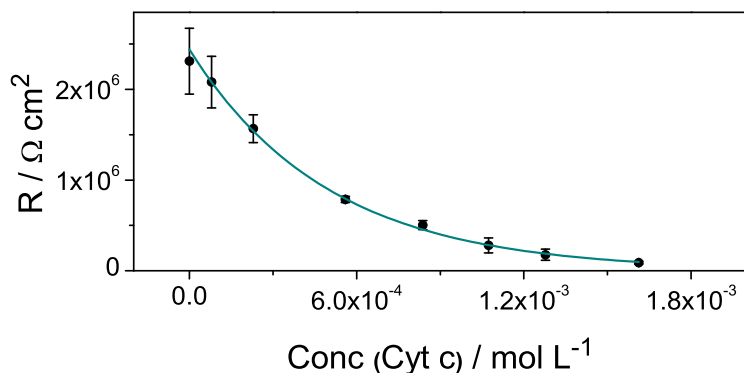


Abbildung 9.6.2: Widerstand des Systems, der sich durch Anfitzen der Impedanzkurven aus Abbildung 9.6.1 unter Benutzung des Äquivalentschaltkreises aus Abbildung 9.5.9 ergibt, als Funktion der Cyt c-Konzentration. Es ergibt sich näherungsweise ein exponentieller Zusammenhang der Form $R(c) = a \cdot e^{-b \cdot c}$, mit $a = 2,44 \pm 0,08 M\Omega$ und $b = 2007,6 \pm 47,9 \text{ L/mol}$.

9.6.1 Zusammenfassung der Abschnitte 9.5 und 9.6

Es konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass die Protein-verankerte Lipid-Membran ein funktionierendes System für die Rekonstitution komplexer Membranproteine in eine Lipidmembran ist. Affinitäts-Metallchromatographie wird routinemäßig zur Aufreinigung von Proteinen benutzt, daher sind ptBLMs als ein System für die Immobilisierung und die Rekonstitution auf einer Oberfläche prinzipiell auf alle Proteine mit Histidin-Anker anwendbar. Dabei ist als Metallion nicht nur Ni^{2+} , sondern auch Cu^{2+} einsetzbar [13]. Auch die Verwendung weiterer Ionen wie Zn^{2+} und Co^{2+} wäre denkbar, da die His-Tag-Aufreinigung auch mit diesen Ionen funktioniert. Die Adsorption der CcO an den Ni^{2+} -NTA-Crosslinker erfolgt orientiert.

In den vergangenen Abschnitten konnte jeder modifizierende Schritt der funktionalisierten Elektrode hin zu der ptBLM-Architektur verfolgt werden. Dabei kamen SPR, FTIR und EIS zum Einsatz. Die Erhaltung der Funktionalität des Enzyms in dieser Konfiguration ermöglicht Untersuchungen zu Enzym-katalysiertem

9.6 Untersuchungen der Funktionalität der Cytochrom c Oxidase in der inversen Orientierung mit dem optimierten ptBLM-System

Transport von Ionen in Abhängigkeit von definierten Transmembranpotentialen. Diese Potentiale können leicht kontrolliert werden, da die funktionalisierte Goldschicht zugleich als Arbeitselektrode dient. Besonderes Interesse in dieser Arbeit gilt der Möglichkeit, das System spektroskopisch analysieren zu können. Die Nutzung von oberflächenverstärkter Infrarotspektroskopie zur Charakterisierung des Systems wurde in diesem Abschnitt bereits gezeigt. Durch die ATR-Konfiguration in Kombination mit der elektrischen Kontrolle des Systems können FTIR-Messungen unter definierten Potentialen durchgeführt werden. Darüber hinaus können aber auch mit Ladungstransfer-Prozessen einhergehende Konformationsänderungen des Enzyms als Funktion angelegter und schnell veränderlicher Potentiale mittels ATR-FTIR-Spektroskopie verfolgt werden (s. Abschnitt 10). Auch weitere spektroskopische Techniken wie SERRS (surface enhanced resonance Raman spectroscopy, oberflächenverstärkte resonante Raman-Spektroskopie) können angewendet werden [150] [16] [17]. Der Einsatz oberflächenanalytischer Techniken wie SPR (wie in diesem Abschnitt gezeigt) ist möglich, ebenso AFM (s. Abschnitt 9.4).

Die Kontrolle der Protein-Orientierung wird dadurch erreicht, dass die rekombinante CcO mit einem Histidin-Anker entweder am C-terminalen Ende von Untereinheit I (Up-Konfiguration) oder am C-terminalen Ende von Untereinheit II (Down-Konfiguration) zur Verfügung steht (s. Abschnitt 3.3, Abbildungen 3.3.1 und 3.3.2). Die Bindungsstelle für Cytochrom c liegt in der cytoplasmatischen Ausbuchtung von Untereinheit II. In der Up-Konfiguration bindet die CcO so an, dass die Matrix-Seite zur Goldoberfläche zeigt. In der Down-Konfiguration weist die cytoplasmatische Seite mit der Cytochrom c-Bindungsstelle zur Goldoberfläche.

Ein zentrales Anliegen aller künstlichen Membransysteme ist ein möglichst großer Submembran-Raum (s. Abschnitt 3.5). Der Vorteil der ptBLM besteht darin, dass der submembrane Raum teilweise durch die Größe des Proteins selbst vorgegeben wird. Der Nachteil z.B. des tBLM-Systems gegenüber dem ptBLM-System ist, dass zwar lange Spacer-Moleküle zur Verfügung stehen, die Spacer-Moleküle selbst aber das Enzym bei der Insertion in die Membran behindern. Voraussetzung bei der ptBLM-Konfiguration ist in jedem Fall, dass der Histidin-Anker an einer frei zugänglichen Stelle am Protein angefügt wurde. Zum anderen Teil bestimmt die Länge des Spacers den submembranen Raum. Sollte noch mehr Platz

ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung des Aufbaus von verankerten Lipid-Membranen (tBLMs und ptBLMs)

unter der Membran erforderlich sein, so können- wie es bei den tBLM-Systemen üblich ist (s. die Verwendung von DPTL, DPHL oder weiteren Thiolipiden)- längere Spacermoleküle verwendet werden. Dies wird dadurch erleichtert, dass die für die Oberflächenpräparation benötigten Chemikalien zumeist kommerziell erwerbbar sind.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die ptBLM ein vielversprechendes System für die Erforschung von Membranproteinen in einer artifiziellen Lipid-Umgebung ist. Die ptBLM erlaubt die Kombination von elektrochemischen und schwingungsspektroskopischen Methoden. Diese Kombination kommt bei den kinetischen und mechanistischen Untersuchungen Redox-aktiver Proteine zum Einsatz. Das ist Gegenstand der nächsten Abschnitte.

9.7 Übertragung des ptBLM-Systems auf andere Systeme

9.7.1 Orientierte Immobilisierung des bakteriellen photosynthetischen Reaktionszentrums in der ptBLM-Architektur

Das Konzept der Protein-verankerten Lipid-Membran ist nicht auf die Cytochrom *c* Oxidase beschränkt. Diese Form der biomimetischen Membran-Architektur eröffnet vielmehr ein ganzes Feld hinsichtlich der Untersuchungen von redoxaktiven Membran-Proteinen. Eine besondere Errungenschaft dieses Systems ist der orientierte Einbau von Enzymen in eine Membran, was mit anderen Methoden der Protein-Immobilisierung nicht möglich ist. Daher ist es wichtig, eine Übertragbarkeit des ptBLM-Systems auf andere Proteine zu zeigen. Als ein Beispiel wird das bakterielle photosynthetische Reaktionszentrum untersucht (s. Abschnitt 3.6). Dieser Abschnitt folgt im Groben dem entsprechenden Abschnitt für die Anbindung der CcO (s. Kapitel 9.5), wobei hier mit FTIR-Spektroskopie nur die Protein-Anbindung selbst und mit SPR die Anbindung und die Membran-Rekonstitution nachvollzogen wird. An den entsprechenden Stellen werden die Ergebnisse jeweils mit denen der CcO-Immobilisierung verglichen.

Anschließend wird das System mittels zyklischer Voltammetrie untersucht.

9.7.2 Verfolgung des Schichtaufbaus mit SPR

In Abbildung 9.7.1 ist die SPR-Aufnahme der Anbindung des Reaktionszentrums und der anschließenden Rekonstitution einer Lipidmembran dargestellt. Die Probenpräparation wird äquivalent zur CcO durchgeführt, so dass die Kinetikkurve direkt mit Abbildung 9.5.6 verglichen werden kann. Abgesehen von einem schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) erhält man ähnliche Ergebnisse. Die Anbindung ist nach etwa 100 Minuten, die Rekonstitution nach etwa 1800 Minuten (30 Stunden) abgeschlossen. Man beachte, dass die Rekonstitution nicht direkt nach Abschluss der Protein-Anbindung, sondern erst nach etwa 700 Minuten eingeleitet wird. Die optischen Schichtdicken, die mit dem Programm Winspall mittels Simulation ermittelt werden, sind in Tabelle 9.7.2 eingetragen.

ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung des Aufbaus von verankerten Lipid-Membranen (tBLMs und ptBLMs)

Zum Vergleich sind auch noch einmal die Werte aus Tabelle 9.5.1 eingetragen. Es fällt auf, dass im Fall des Reaktionszentrums die Schichtdickenzunahme durch das Protein deutlich geringer ist als im Fall der CcO. Sie beträgt nur 5,13nm im Vergleich zu 8,68nm bei der CcO. Durch die Membran-Rekonstitution nimmt die Schichtdicke nochmals um etwa 2nm auf 7,18nm zu.

Diese Messungen werden durch die uns bekannten Dimensionen der Proteine bestätigt: das Reaktionszentrum ist mit einer lateralen Ausdehnung von 4nm und einer Höhe von 6nm kleiner als die Cytochrom c Oxidase ($4,5 \times 7\text{nm}$, Höhe=9nm). Die beiden Proteine sind zu Vergleichszwecken in Abbildung 9.7.3 in demselben Maßstab nebeneinander dargestellt.

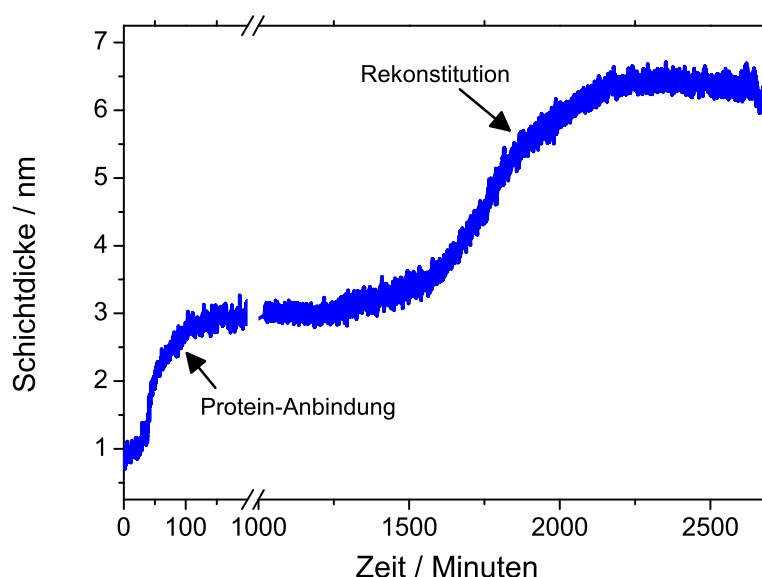


Abbildung 9.7.1: Kinetikmessung der Anbindung des Reaktionszentrums und der Membran-Rekonstitution.

9.7.3 Verfolgung der Anbindung mit ATR-FTIR-Spektroskopie

Im nächsten Schritt soll die Anbindung des Reaktionszentrums auch mittels oberflächenverstärkter ATR-FTIR-Spektroskopie gezeigt werden. In Abbildung 9.7.4 ist das Ergebnis dargestellt. Es treten weniger Markerbanden auf, jedoch können

9.7 Übertragung des ptBLM-Systems auf andere Systeme

Enzym	CcO	Reaktionszentrum
d(Protein) / nm	8,7	5,1
d(Protein+Membran) / nm	9,6	7,2

Abbildung 9.7.2: Durch Simulation der SPR-Kurven erhaltene Schichtdicken. Die Werte für die CcO sind zum Vergleich mit in die Tabelle aufgenommen.

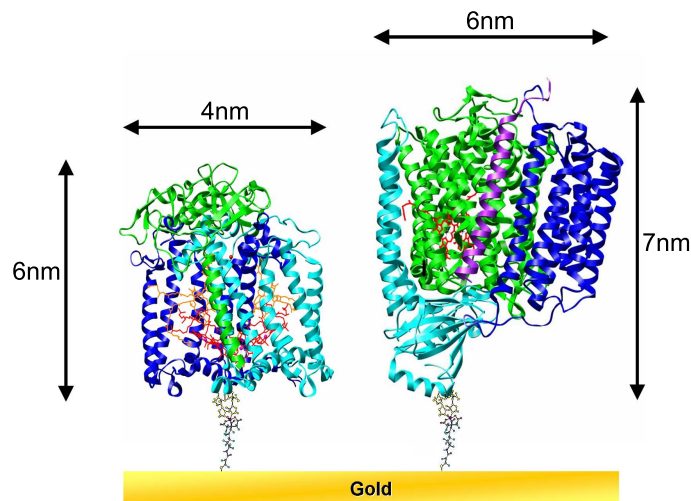


Abbildung 9.7.3: Die beiden auf einer Goldschicht verankerten Membranproteine Cytochrom c Oxidase (rechts) und das bakterielle photosynthetische Reaktionszentrum (links) im Größenvergleich.

mit der Amid-I (1656 cm^{-1}) - und der Amid-II (1542 cm^{-1})-Bande die beiden wichtigsten und meist am stärksten ausgeprägten Markerbanden für das Polypeptidgerüst eines Proteins identifiziert werden (vgl. Abschnitt 9.5.2.2). Auf eine kinetische Analyse der FTIR-Daten wurde aufgrund des schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses verzichtet. Anhand der SPR-Kinetik (s. vorhergehender Abschnitt) lässt sich aber ersehen, dass der Anbindungsprozess ähnlich schnell wie im Fall der CcO abläuft.

ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung des Aufbaus von verankerten Lipid-Membranen (tBLMs und ptBLMs)

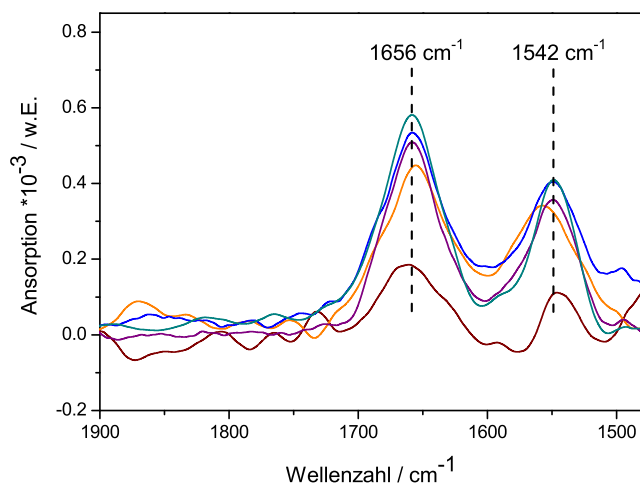


Abbildung 9.7.4: FTIR-Spektren der Anbindung von bakteriellem Reaktionszentrum an die TP-NTA-Ni-Gruppe. Abgebildet ist der Amid-I/Amid-II-Bereich.

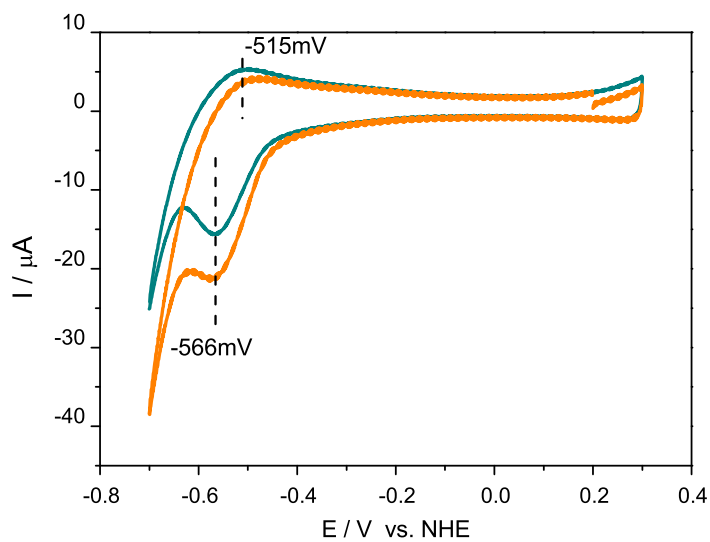


Abbildung 9.7.5: Zyklische Voltammogramme am immobilisierten Reaktionszentrum mit einer Scan-Rate von 100mV/s. Grün: Probe abgedunkelt, orange: Probe beleuchtet.

9.7.4 Ladungstransferprozesse im Reaktionszentrum

Nach erfolgter Anbindung in der kombinierten SPR-/EC-Zelle wird das Reaktionszentrum mittels zyklischer Voltammetrie untersucht. Es wird ein Spannungsbereich zwischen +300mV und -700mV mit einer (Standard-)Scan-Rate von 100mV/s in fünf aufeinander folgenden Scans abgefahren. Die grüne Kurve in Abbildung 9.7.5 ist das Ergebnis einer Messung an einer abgedunkelten Probe, wohingegen die orange-farbene Kurve kurz darauf an derselben Probe gemessen wurde, die jetzt aber mit einer starken Lichtquelle bestrahlt wird (sichtbares Licht einer Schwanenhalslampe). In beiden Fällen ist ein deutlich ausgeprägter reduktiver Peak bei -566mV und ein schwach ausgeprägter oxidativer Peak bei ca. -515mV zu beobachten. Die Stromstärke liegt im μA -Bereich, sie erreicht bei der dunklen Probe bei -700mV $-25\mu\text{A}$, bei der beleuchteten Probe erreicht sie $-38\mu\text{A}$. Die Fläche des reduktiven Peaks ist in beiden Fällen ähnlich groß, die der übertragenden Ladung entsprechende Peakfläche beträgt 64mC. Der Gesamtstrom ist jedoch bei der beleuchteten Probe katalytisch um etwa das 1,5fache verstärkt.

Dieser Versuch soll zeigen, dass das ptBLM-System auf weitere Enzyme übertragbar ist und diese ebenfalls (wie die CcO) Aktivität zeigen. Die vorläufige Annahme an dieser Stelle ist die, dass mit dem Redoxpeak-Paar im zyklischen Voltammogramm die Reduktion und die Oxidation des speziellen Paares P960 gezeigt wird. Die Beobachtung des verstärkten Stromes stützt diese These, da Absorption von Licht im P960 zu einem schnellen Transfer eines Elektrons von dieser Stelle zu einem Bakteriopheophytin führt und eine photoinduzierte Ladungstrennung hervorruft (s. Abschnitt 3.6). Die nähere Analyse durch weiterführende Experimente ist Gegenstand folgender Arbeiten und kann hier nicht behandelt werden.

ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung des Aufbaus von verankerten
Lipid-Membranen (tBLMs und ptBLMs)

Kapitel 10

Zeitaufgelöste

ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung der Kinetik des direkten Elektronentransfers in der CcO

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die Redoxzentren der Cytochrom *c* Oxidase in der ptBLM angesprochen werden können. Aus der pro Zyklus übertragenen Ladung kann gefolgert werden, dass vier Elektronen übertragen werden (s. Abschnitt 9.4.5). In [151] und [15] sowie [17] (Dissertation von M. Friedrich) wurden Ergebnisse aus Experimenten präsentiert, bei denen der Redoxzustand der Häm-Zentren bei unterschiedlichen Potenzialen untersucht wurde. Im Vergleich mit Raman-Messungen an CcO in Lösung zeigte sich, dass die gleichen charakteristischen Banden für die reduzierte und die oxidierte Form der Häm-Zentren gemessen werden können. Die Raman-Spektroskopie eignet sich sehr gut zur Detektion des Redoxzustandes der Metalloporphyrine in den Hämen (low-spin/high-spin), nicht jedoch für die Detektion der Redoxzustände der Häme. Hier setzt die vorliegende Arbeit an, denn die Redoxzentren umgebenden Peptidgruppen lassen sich sehr gut mit Infrarotstrahlung zu Schwingungen anregen. Aus unabhängigen, statischen Infrarotmessungen ist bekannt, dass sich die Redoxzustände aller vier Zentren (Cu_A , Häm *a*, Häm *a*₃ und Cu_B) durch charak-

teristische Banden im Infrarotspektrum nachweisen lassen [23] [24] [25] [22] [26] [27] [28] [29]. Somit ergänzen sich die beiden Methoden- Raman-Spektroskopie und Infrarotspektroskopie.

Mit elektrochemischen Methoden ist es gelungen, die Zeitkonstanten für die Oxidation und die Reduktion der Redoxzentren zu ermitteln [15] [17]. Das Ziel dieser Arbeit ist es, zunächst zu zeigen, dass der Nachweis der Oxidation bzw. der Reduktion der Redoxzentren in der Cytochrom c Oxidase in der ptBLM-Konfiguration mittels Infrarotspektroskopie gelingt. Anschließend sollen auch die Zeitkonstanten für die Redoxprozesse auf spektroskopischem Wege ermittelt werden, was bisher noch nicht gelungen ist.

Alle in diesem Kapitel durchgeführten Experimente bis auf Abschnitt 10.5 werden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt, um die Kinetik des direkten Elektronentransfers auflösen zu können. Im aeroben Fall wird erwartet, dass der Elektronentransfer aufgrund der katalysierten Reaktion von Sauerstoff, Protonen und Elektronen zu Wasser wesentlich schneller als im anaeroben Fall abläuft.

Die Zuordnung der Banden erfolgt hauptsächlich nach Tabelle D.3.1 [23]. In dieser Arbeit wurden ebenfalls potentiostatische Messungen an der Cytochrom c Oxidase durchgeführt und beobachtete Absorptionsbanden mehreren Arbeiten folgend (insbesondere [26] und der Arbeit von Barth [22] (The infrared absorption of amino acid side chains)) bestimmten Sekundärstrukturen und Seitengruppen zugeordnet. Dabei wird eine Abweichung von bis zu 3 Wellenzahlen zugelassen.

10.1 Potentiostatische Messungen

In diesem Abschnitt werden Messungen präsentiert, bei denen das Potential vom komplett reduzierten Zustand des Proteins bei -700mV bis zum komplett oxidierten Zustand bei +300 mV in Schritten von 100 mV variiert wird und jeweils statische FTIR-Spektren aufgenommen werden. Es wird jeweils Scans über 10 Minuten aufakkumuliert. Die Absorptionsspektren des zunehmend oxidierten Enzyms für den Bereich 1800 cm^{-1} bis 1370 cm^{-1} sind in Abbildung 10.1.1 dargestellt. Da in dieser Messung nur die Differenz zwischen reduziertem und oxidiertem Zustand gemessen wird, ist es nicht von Belang, ob der reduzierte oder der oxidierte

10.1 Potentiostatische Messungen

Zustand als Referenz benutzt wird.

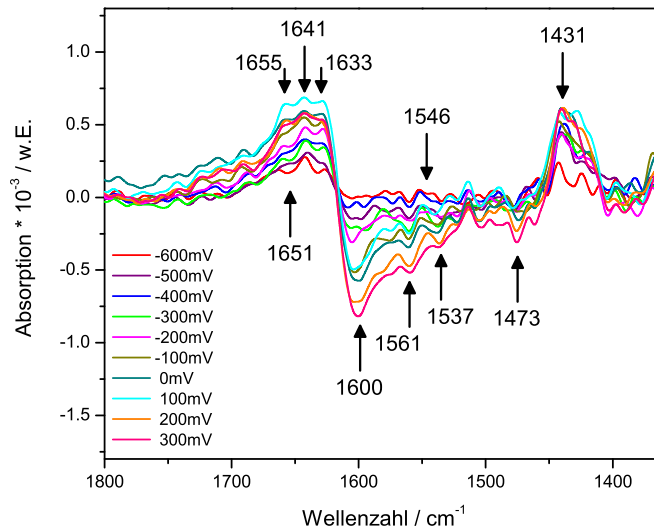


Abbildung 10.1.1: Änderungen des Redoxzustandes der Zentren Cu_A , Häm a und Häm a_3 . Zuordnung der Banden: Cu_A : 1651, 1600, 1431 cm^{-1} ; Häm a: 1546, 1537 cm^{-1} ; Häm a_3 : 1655, 1641, 1633, 1561, 1473 cm^{-1} . Eine genaue Zuordnung zu den umgebenden Gruppen bzw. Sekundärstrukturen ist im Text bzw. in den Tabellen D.3.1, 10.1.1, 10.1.2 und 10.1.3 gegeben.

Es ist zu erkennen, dass die Änderungen im Redoxzustand des Cu_A die deutlichsten Änderungen im Absorptionsspektrum hervorrufen. Es können vier Banden bei 1651, 1600, 1473 und 1431 cm^{-1} zugeordnet werden. Die genaue Zuordnung ist in Tabelle D.3.1 vorgenommen worden. Die relevanten Banden für diese Messung sind nochmals in den Tabellen 10.1.1, 10.1.2 und 10.1.3 zusammengefasst. Die Oxidation im Häm a-Zentrum zeigt sich in Banden bei 1546 und 1537 cm^{-1} . Die Oxidation im Häm a_3 -Zentrum zeigt sich in Banden bei 1655, 1641, 1630 und 1527 cm^{-1} .

Zeitaufgelöste ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung der Kinetik des direkten Elektronentransfers in der CcO

Bandenlage/ cm ⁻¹	Redox- zentrum	Redox- zustand	Zuordnung der Bande (Absorber; Schwingung; zugeordnete Seitenkette)
1651	Cu _A	red	Amid I, α-Helix; ν(C=O)
1603	Cu _A	red	Amid I, β-Faltblatt; ν(C=O)
1431	Cu _A	ox	W, Trp-NH; δ(CH), ν(CC), ν(CN); W121 / D, Asp-COOH; δ(COH); D178 / E, Glu-COO ⁻ ; ν _s (COO ⁻); E218

Tabelle 10.1.1: Auszug aus Tabelle D.3.1: Cu_A-Peaks in den potentiostatischen Spektren

Bandenlage/ cm ⁻¹	Redox- zentrum	Redox- zustand	Zuordnung der Bande (Absorber; Schwingung; zugeordnete Seitenkette)
1546	Häm a	red	Häm, ν _{38y} [26]
1537	Häm a	ox	Propionat [25]

Tabelle 10.1.2: Auszug aus Tabelle D.3.1: Häm a-Peaks in den potentiostatischen Spektren

Bandenlage/ cm ⁻¹	Redox- zentrum	Redox- zustand	Zuordnung der Bande (Absorber; Schwingung; zugeordnete Seitenkette)
1655	Häm a ₃	ox	Amid I, α-Helix; ν(C=O)
1641	Häm a ₃	ox	Formyl; ν(C=O) [27] / Amid I, β-Faltblatt; ν(C=O)
1630	Häm a ₃	red	R, Arg-H ₅ ⁺ ; ν _s (CN ₃ H ₅ ⁺); R473 H, HisH ₂ ⁺ ; ν(C=C); H403 [22] / Formyl [24] / Amid I, β-Faltblatt; ν(C=O)
1561	Häm a ₃	red	Propionat / Häm; ν _{38s} / Häm; ν _{38y} [26]
1473	Häm a ₃	red	F, δ _{as} (CH ₃); F412 [22] / Häm; A _{1g} , ν ₃ [24]

Tabelle 10.1.3: Auszug aus Tabelle D.3.1: Häm a₃-Peaks in den potentiostatischen Spektren

Vergleich mit Raman-Messungen [15] (Friedrich et al.) Im Vergleich mit Raman-spektroskopischen Messungen lässt sich festhalten, dass die potentiostatische Titration der Cytochrom c Oxidase mit beiden Methoden gut zu verfolgen ist. In der Raman-Spektroskopie kann man jedoch lediglich die charakteristischen Banden der Häme isolieren. Der entscheidende Vorteil der Infrarot-Spektroskopie ist aber, dass auch die Redoxzustände des Cu_A-Zentrums nachgewiesen werden können.

10.2 Kinetische Parameter der Oxidoreduktion des Häm a₃-Zentrums

In diesem Abschnitt wird ein Experiment mit einer langsamen Anregungsfrequenz von 0,8 Hz und einer Zeitauflösung von $\Delta t = 78ms$ betrachtet. Die entsprechenden Messungen werden im Rapid-Scan-Modus durchgeführt. Das Messprinzip ist in Abschnitt 8.2.3 erklärt. Die Anzahl n der Zeitscheiben beträgt 16, mit der Zeitauflösung von $\Delta t = 78ms$ ergibt sich eine Anregungsperiode von 1,25 s. Das Potenzial wird zwischen -700 mV +300 mV hin- und hergeschaltet.

Am ersten Beispiel soll auch die Vorgehensweise bei der Auswertung aller zeitaufgelösten Experimenten in dieser Arbeit erläutert werden.

In Abbildung 10.2.1 (a) sind die demodulierten PSD-Spektren eines Versuches einer Anregungsfrequenz von $f=0,8$ Hz in Schritten von $\Delta\varphi = 15^\circ$ dargestellt. In den phasenaufgelösten Spektren wird das Rauschen größtenteils eliminiert (s. zum Vergleich die zeitaufgelösten Spektren desselben Experimentes in Abbildung 10.2.2 (a)). Wegen des besseren SNR werden die Parameter (Lage und Halbwertsbreite) charakteristischer Banden zunächst in den PSD-Spektren bestimmt. Mit der OPUS-Fitroutine (s. Abschnitt A.3.2) werden die Banden dann an die Spektren angefitet. In Abbildung 10.2.1 (b) wurden an das 15° -Spektrum 8 Banden angefitet. In (a) sind dabei nur die 4 Banden eingezeichnet, auf die in der weiteren Betrachtung näher eingegangen wird. Die hier gefundenen Fitparameter (Bandenlage, Halbwertsbreite) werden anschließend auch für die Fits der entsprechenden zeitaufgelösten Spektren (s. Abbildung 10.2.2 (a)) verwendet. Hier wird die Stärke dieser Methode deutlich, denn in den von Rauschen überlagerten zeitaufgelösten Spektren wäre eine Bestimmung der relevanten Banden nur z.T.

möglich und mit großen Fehlern behaftet.

In Abbildung 10.2.2 (b) sind die entsprechenden Fits dargestellt. Die Originalspektren sind grau unterlegt abgebildet. Jeder einzelne Peak kann so von den anderen, überlagernden Banden isoliert werden. Die Fläche der Peaks ist jetzt zu jeder Phasenlage und zu den gemessenen Zeiten bekannt, wodurch eine detaillierte Analyse möglich ist.

10.2.1 Phasenlage der identifizierten Banden

Als nächstes werden die identifizierten Banden auf ihre Phasenverschiebung gegenüber dem Anregungssignal hin untersucht. Gar keine bzw. eine geringe Phasenverschiebung deuten auf eine Kinetik des entsprechenden Prozesses im Bereich der Anregungsfrequenz hin. Je stärker die Phasenverschiebung, desto schlechter kann der Prozess der Anregungsfrequenz folgen. Die Phasenverschiebung berechnet sich (s. Gleichung 4.4.28) zu

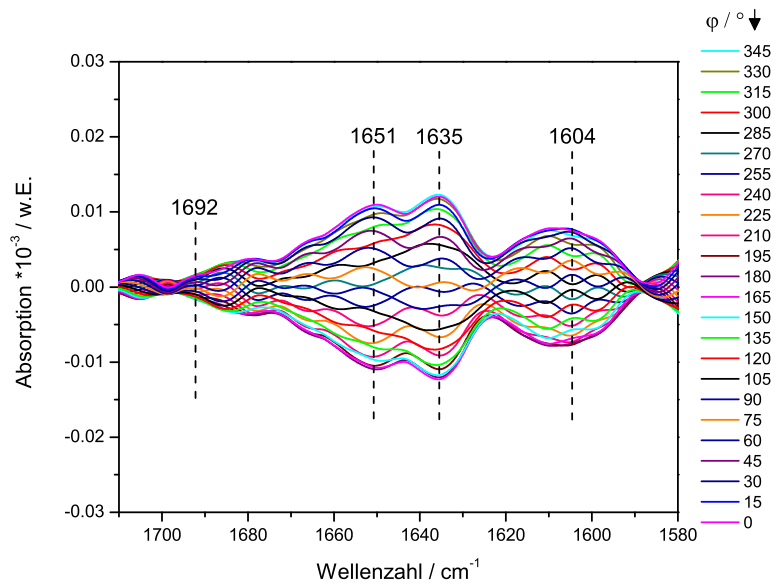
$$\varphi = \arctan \frac{A_k^{90^\circ}(\tilde{\nu})}{A_k^{0^\circ}(\tilde{\nu})} \quad (10.2.1)$$

Bande / cm^{-1}	$\varphi/^\circ$	Zugeordnetes Redoxzentrum
1604	6,8	Cu _A
1635	-20,1	Häm a ₃
1651	-4,4	Cu _A

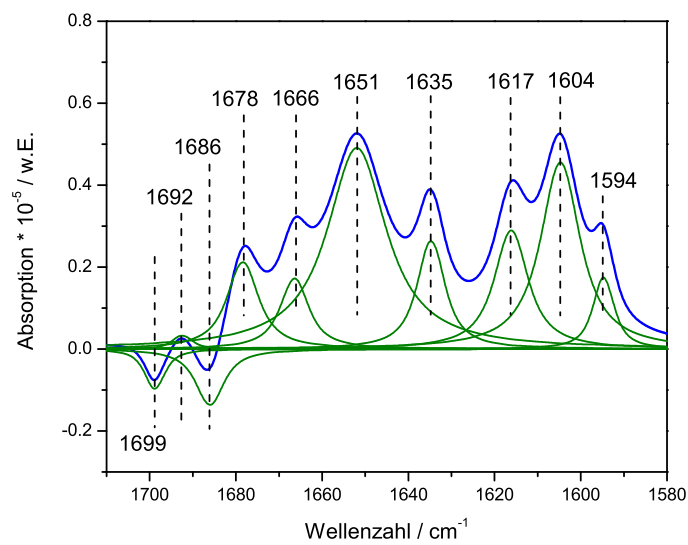
Tabelle 10.2.1: Phasenverschiebungen φ für die drei ausgeprägtesten Banden in Abbildung 10.2.2.

Nach [23] (s. Tabelle D.3.1) lassen sich die beiden ausgeprägtesten Banden im Amid-I-Bereich bei 1604 cm^{-1} und 1651 cm^{-1} der Oxidoreduktion des Cu_A-Zentrums zuordnen. Die Bande bei 1635 cm^{-1} hingegen wird dem Häm a₃-Zentrum zugeordnet. Auch Peptidbindungen im β -Faltblatt tragen zu dieser Bande bei. Die Phasenwinkel der 3 Banden sind in Tabelle 10.2.1 eingetragen. Für die beiden Cu_A-Banden ergeben sich Winkel um null Grad. Die zum Häm a₃ gehörende Bande zeigt einen Winkel von $-20,1^\circ$. Diese Werte sind so zu erklären, dass das Cu_A-Zentrum eine wesentlich kleinere Zeitkonstante von ca. $250\mu\text{s}$ für

10.2 Kinetische Parameter der Oxidoreduktion des Häm a₃-Zentrums



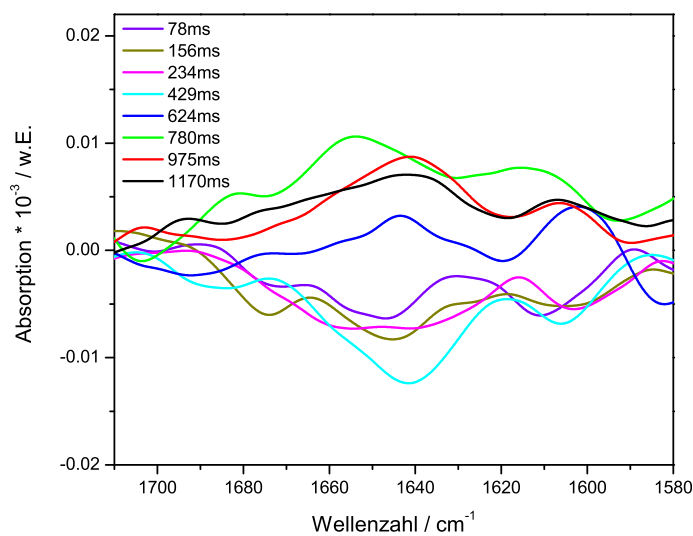
(a)



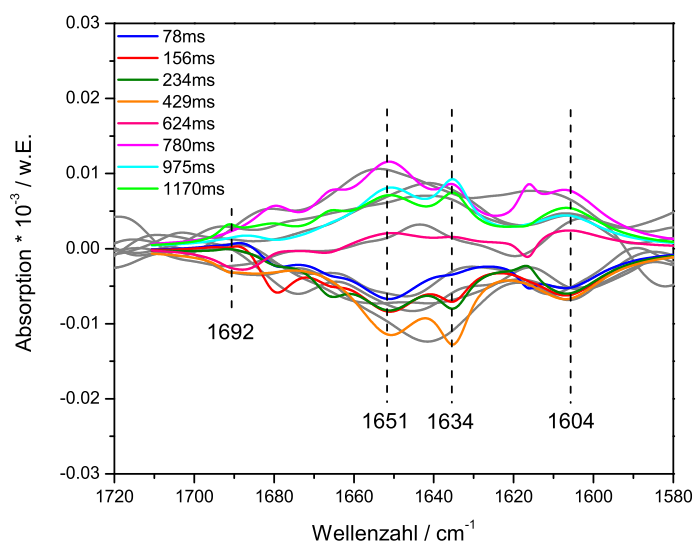
(b)

Abbildung 10.2.1: (a) Phasenaufgelöste FTIR-Spektren einer Messung mit einer Anregungsfrequenz von 0,8 Hz. Die Winkelaufösung beträgt $\Delta\varphi=15^\circ$. (b) Angefittete Banden.

Zeitaufgelöste ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung der Kinetik des direkten Elektronentransfers in der CcO



(a)



(b)

Abbildung 10.2.2: (a) Zeitaufgelöste FTIR-Spektren mit einer Zeitauflösung von $\Delta t = 78\text{ms}$. Teilweise wurden zur Verbesserung des SNR zwei Spektren auf Kosten der Zeitauflösung gemittelt. (b) Angefit-tete Kurven mit den aus Abbildung 10.2.1 (b) übernommenen Fitparametern. Die Originalkurven sind grau unterlegt darge-stellt.

10.2 Kinetische Parameter der Oxidoreduktion des Häm a₃-Zentrums

die Oxidoreduktion hat (s. Abschnitt 10.3.3). Es gibt hier kaum eine Phasenverschiebung, da die Oxidoreduktion des Cu_A-Zentrums der Anregung „gut folgen“ kann. Der unphysikalische leicht positive Wert von +5,7° (die Antwort kann der Anregung nicht vorauslaufen) ist durch die Fehler zu erklären, mit denen die Werte behaftet sind. Der Wert für das Häm a₃-Zentrum von -20,1 ° zeigt, dass dieses Zentrum bereits eine Phasenverschiebung gegen die Anregung aufweist. Die Reduktion bzw. Oxidation des dritten Redoxzentrums benötigt mehr Zeit, woraus diese Phasenverschiebung resultiert. Für das Häm a₃-Zentrum soll im Folgenden die Zeitkonstante für die Oxidoreduktion berechnet werden:

Zeitkonstante der Redoxprozesse des Häm a₃-Zentrums Die Zeitkonstanten der Reduktion und der Oxidation des Häm a₃-Zentrums können aus der zeitabhängigen Fläche des Absorptionspeaks bei 1635 cm⁻¹ berechnet werden. Dieser Peak kann nach [23] einer Kombination aus Schwingungen verschiedener, das Häm a₃-Zentrum umgebenden Gruppen zugeordnet werden, darunter ist auch eine Komponente der charakteristischen β-Faltblatt-Schwingung bei 1635 cm⁻¹ (s. Tabelle D.3.1). In Tabelle D.3.1 wird die Frequenz zwar mit 1630 cm⁻¹ angegeben. Nach [22] kann die beteiligte Arginin-Schwingung aber in einem Bereich von 1633-1636 cm⁻¹ auftreten. Die beteiligten antiparallelen β-Faltblatt-Schwingungen können nach [72] in einem Bereich von 1630-1636 cm⁻¹ auftreten. In Abbildung 10.2.3 ist die Peakfläche in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Das Potential wird bei t=0ms auf -700mV gestellt (reduktiver Ast), bei t=546ms erfolgt ein Sprung auf +300mV (oxidativer Ast). Monoexponentiale dreiparametrische Kurven der Form

$$x(t) = a \cdot (1 - \exp(-t/\tau)) \quad (10.2.2)$$

werden an den reduktiven und den oxidativen Ast angefitet. Auf einen Fit mit einer Exponentialfunktion höherer Ordnung, was den komplexen Reaktionsketten in der CcO eher gerecht würde, muss verzichtet werden, da hierfür zu wenig Datenpunkte vorliegen. Einen Hinweis auf die kinetischen Prozesse geben jedoch auch diese vereinfachten Fits. Für die Reduktion ergibt sich eine Zeitkonstante von $\tau = 176,1 \pm 29,8$ ms, dies entspricht $k_s = 5,7 \pm 0,1$ Übergängen pro Sekunde. Für die Oxidation ergibt sich eine Zeitkonstante von $\tau = 72,5 \pm 12,2$ ms, dies entspricht $k_s = 13,8 \pm 2,3$ Übergängen pro Sekunde. Im Mittel aus Reduktion

Zeitaufgelöste ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung der Kinetik des direkten Elektronentransfers in der CcO

und Oxidation erhält man so eine Zeitkonstante von $\tau = 124,3 \pm 21$ ms bzw. $9,8 \pm 1,2$ Transitionen pro Sekunde.

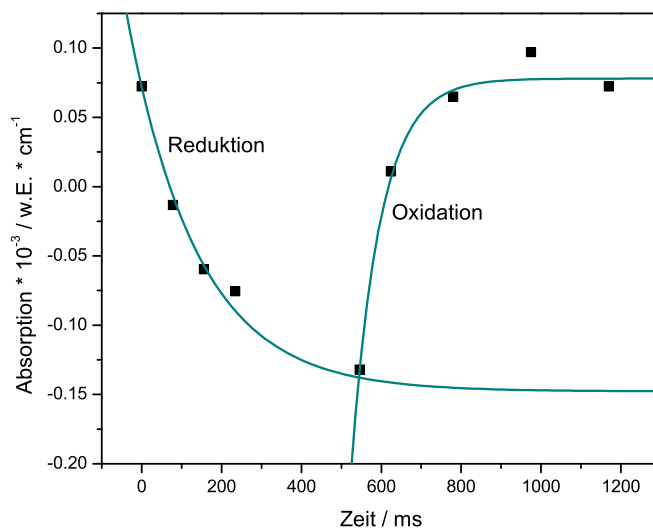


Abbildung 10.2.3: Peakfläche der Bande bei 1635 cm^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit bei einer Anregungsfrequenz von $0,8 \text{ Hz}$. Zunächst ist der reduktive Ast dargestellt, dann folgt die Oxidation bei Umschalten des Potentials von -700 mV auf $+300 \text{ mV}$. Anfiten dreiparametriger monoexponentieller Funktionen nach Gleichung 10.2.2 liefert für den reduktiven Ast eine Zeitkonstante von $\tau = 176,1 \pm 29,8 \text{ ms}$, dies entspricht $k_s = 5,7 \pm 0,1$ Übergängen pro Sekunde. Für die Oxidation ergibt sich eine Zeitkonstante von $\tau = 72,5 \pm 12,2 \text{ ms}$, dies entspricht $k_s = 13,8 \pm 2,3$ Übergängen pro Sekunde.

10.3 Kinetische Parameter der Oxidoreduktion des Cu_A- und des Häm a₃-Zentrums

In diesem Abschnitt wird eine Messreihe präsentiert, bei der eine Probe bei mehreren unterschiedlichen Anregungsfrequenzen vermessen werden konnte. Auf diese Weise gelingt es besonders gut, Aussagen über kinetische Zusammenhänge bei der Oxidoreduktion von Cu_A und Häm a₃ zu treffen.

10.3.1 Langsame Anregungsfrequenz- 0,13 Hz

Der erste Versuch erfolgt mit einer langsamen Anregungsfrequenz von 0,13 Hz, dies liegt in einer ähnlichen Größenordnung wie die im im vorangegangenen Abschnitt verwendeten 0,8 Hz, weswegen die Spektren dieser beiden Versuche sehr ähnliche Strukturen zeigen.

Zunächst werden wieder die phasenaufgelösten Spektren dieses Versuches angefitet und analysiert. Die phasenaufgelösten Spektren sind in Abbildung 10.3.1 abgebildet. Die Spektren zeigen mehrere Banden, die auch bei einer Anregungsfrequenz von 0,8 Hz (s. Abbildung 10.2.1) zu sehen sind. Insbesondere sind dies die beiden Cu_A-Banden bei 1601 und 1649 cm⁻¹ und die Häm a₃-Bande bei 1632 cm⁻¹. Diese drei Banden stimmen im Rahmen der Fehler mit den Banden des Versuches mit der Anregungsfrequenz 0,8 Hz überein.

Phasenanalyse Die angefiteten Banden werden einer Phasenanalyse gemäß Abschnitt 10.2.1 unterzogen. Die Phasenverschiebungen der drei betrachteten Banden sind in Tabelle 10.3.1 eingetragen. Wie zu erwarten war, bewegen sich die Phasenverschiebungen alle um Null herum. Die Anregungsfrequenz ist gegenüber 0,8 Hz mit 0,13 Hz nochmals rund 6 mal langsamer. Schon bei 0,8 Hz konnte das System der Anregungsfrequenz gut folgen. Das Häm a₃-Zentrum wies dort noch eine Phasenverschiebung von 20,1 ° auf. Hier wird eine Phasenverschiebung von -2 ° gemessen, was bedeutet, dass die Oxidoreduktion fast genau in Phase zur Anregungsfrequenz ist. Dass praktisch keine Phasenverschiebung vorliegt, ist auch an den zeitaufgelösten Spektren abzulesen (Abbildung 10.3.2).

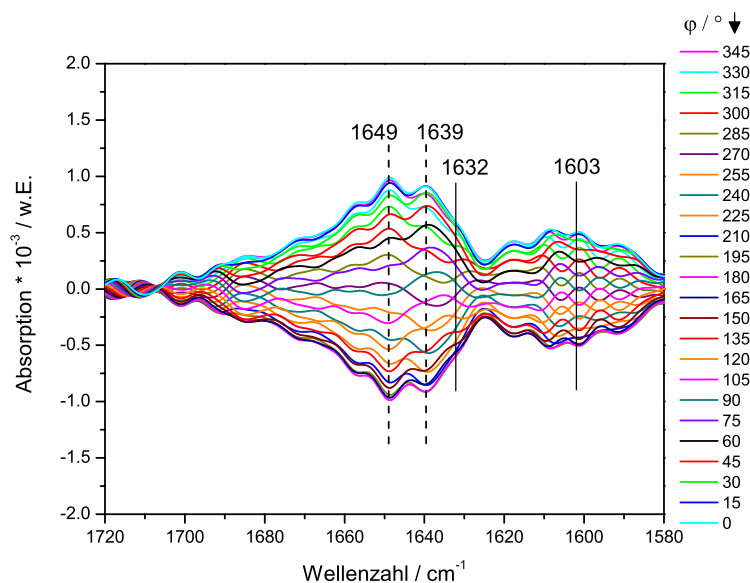


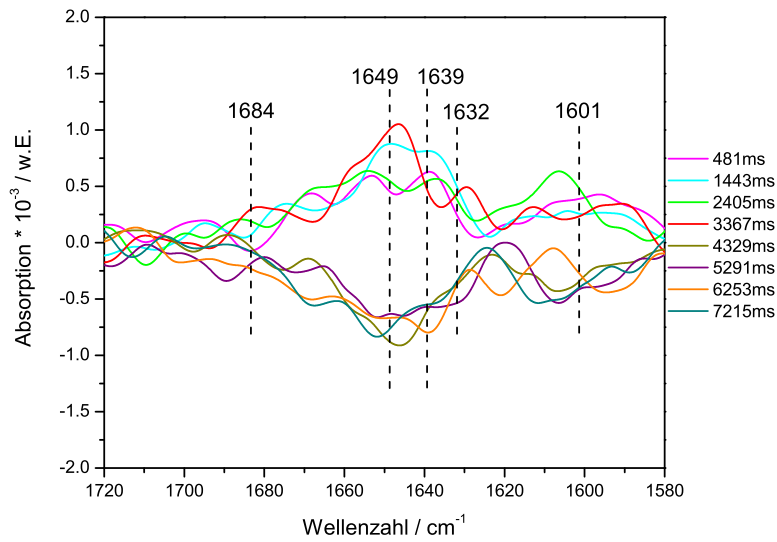
Abbildung 10.3.1: Phasenaufgelöste FTIR-Spektren mit einer Winkelauflösung von $\Delta\varphi=15^\circ$. Die Anregungsfrequenz beträgt 0,13Hz.

Bande / cm^{-1}	$\varphi/^\circ$	Zugeordnetes Redoxzentrum
1603	5	Cu_A
1632	-2	Häm a_3
1649	-8,7	Cu_A

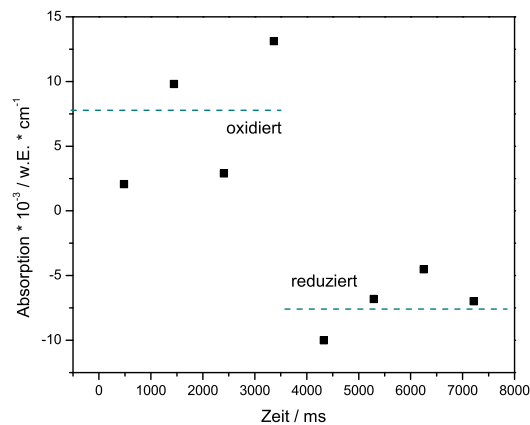
Tabelle 10.3.1: Phasenverschiebungen φ für drei charakteristische Banden in Abbildung 10.3.1.

Zeitaufgelöste Spektren In Abbildung 10.3.2 sind die zeitaufgelösten Spektren dieses Versuches aufgetragen. Man erkennt deutlich die Separation der Kurven in zwei Gruppen, den oxidierten und den reduzierten Zustand. Dies ist auf die sehr niedrige Anregungsfrequenz von nur 0,13 Hz und eine entsprechende grobe Zeitauflösung zurückzuführen. Eine kinetische Analyse hinsichtlich der Bestimmung von Zeitkonstanten für die Redoxzentren ist nicht möglich, das Experiment bestätigt aber mit der Lage der Banden die anderen gezeigten Versuche. Reduzierter und oxidiertes Zustand lassen sich sehr gut voneinander unterscheiden.

10.3 Kinetische Parameter der Oxidoreduktion des Cu_A- und des Häm a₃-Zentrums



(a)



(b)

Abbildung 10.3.2: (a) Zeitaufgelöste FTIR-Spektren mit einer Zeitauflösung von $\Delta t=962$ ms. Die Anregungsfrequenz beträgt 0,13 Hz. Man erkennt deutlich die Separation der Kurven in zwei Gruppen, den oxidierten und den reduzierten Zustand. (b) Die Peakfläche des Cu_A-Peaks bei 1649 cm^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Es wird deutlich, dass sich keine Exponentialfunktionen anfitzen lassen, dass sich aber sehr wohl der oxidierte und der reduzierte Zustand des Redoxzentrums gut unterscheiden lassen.

10.3.2 Mittlerer Bereich- Anregungsfrequenz 100 Hz

Im diesem Versuch wird dieselbe Probe mit einer Frequenz von 100Hz angeregt und zeitaufgelöste FTIR-Spektren werden im Step-Scan-Modus aufgenommen. In Abbildung 10.3.3 sind die phasenaufgelösten FTIR-Spektren dargestellt.

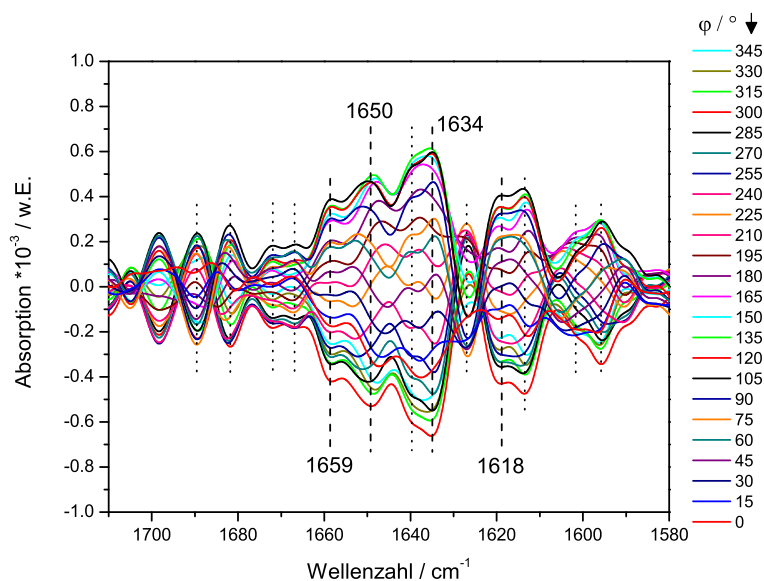


Abbildung 10.3.3: Phasenaufgelöste FTIR-Spektren mit einer Winkelauflösung von $\Delta\varphi=15^\circ$. Die Anregungsfrequenz ist 100Hz.

Phasenanalyse Die gleichen Banden wie im vorangegangenen Abschnitt werden einer Phasenanalyse unterzogen. Sie sind in Tabelle 10.3.2 eingetragen. Die Phasenverschiebung für den Cu_A -Peak bei 1602 cm^{-1} liegt mit 5° nahe bei Null, womit sich darauf schließen lässt, dass die Oxidoreduktion des Cu_A -Zentrums voll in Phase mit der Anregungsfrequenz ist. Der zweite Cu_A -Peak bei 1650 cm^{-1} weist bereits eine sehr deutliche Phasenverschiebung von $-43,4^\circ$ auf. Dieser Unterschied kann dadurch erklärt werden, dass die mit dem 1602 cm^{-1} -Peak in Zusammenhang stehenden Konformationsänderungen einen β -Faltblatt-Anteil beinhalten, die Konformationsänderungen in Zusammenhang mit dem 1650 cm^{-1} -Peak jedoch einen α -Helix-Anteil. Der Bereich der β -Faltblätter wird von den Elektronen zuerst erreicht, da sich dieser direkt an der Cytochrom-c-Andockstelle befindet. Die direkte Umgebung des Cu_A -Zentrums besteht aus α -Helices (s. Abbildung

10.3 Kinetische Parameter der Oxidoreduktion des Cu_A- und des Häm a₃-Zentrums

3.3.1). Hier treffen die Elektronen anschließend ein, weswegen es zu einer stärkeren Phasendifferenz kommt. Das Häm a₃-Zentrum schließlich befindet sich noch weiter im Innern des Proteins, so dass die mit diesem Zentrum in Zusammenhang stehenden Konformationsänderungen mit -52,8 ° eine noch etwas größere Phasendifferenz aufweisen.

Bande / cm ⁻¹	φ/°	Zugeordnetes Redoxzentrum
1602	5	Cu _A
1634	-52,8	Häm a ₃
1650	-43,4	Cu _A

Tabelle 10.3.2: Phasenverschiebungen φ für vier charakteristische Banden in Abbildung 10.3.1.

Zeitaufgelöste Spektren und Zeitkonstante des Cu_A-Zentrums In Abbildung 10.3.4 sind die zeitaufgelösten Spektren der 100 Hz-Messung aufgetragen, in Abbildung 10.3.5 ist die Peakfläche des Cu_A-Peaks bei 1650 cm⁻¹ in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Man erkennt, dass die zeitaufgelösten Spektren sehr verrauscht sind. Aus diesem Grund ist es schwierig, eine Information über die Zeitkonstante für die Oxidoreduktion der Redoxzentren zu bekommen. Mit dem Cu_A-Peak bei 1650 cm⁻¹ gelingt dies noch einigermaßen: es ergibt sich eine Zeitkonstante von $\tau=854,7\pm 467,5 \mu\text{s}$, dies entspricht $k_s = 1170\pm 640$ Übergängen pro Sekunde. Wie bereits erwähnt, ist 100 Hz eine Anregungsfrequenz, bei der mit den benutzten Spektrometern vergleichsweise wenig Signal aufakkumuliert werden kann. Im folgenden Abschnitt gelingt mit einer höheren Anregungsfrequenz die Aufnahme besserer Spektren und damit auch eine bessere Bestimmung der Zeitkonstanten für das Cu_A-Zentrum.

Zeitaufgelöste ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung der Kinetik des direkten Elektronentransfers in der CcO

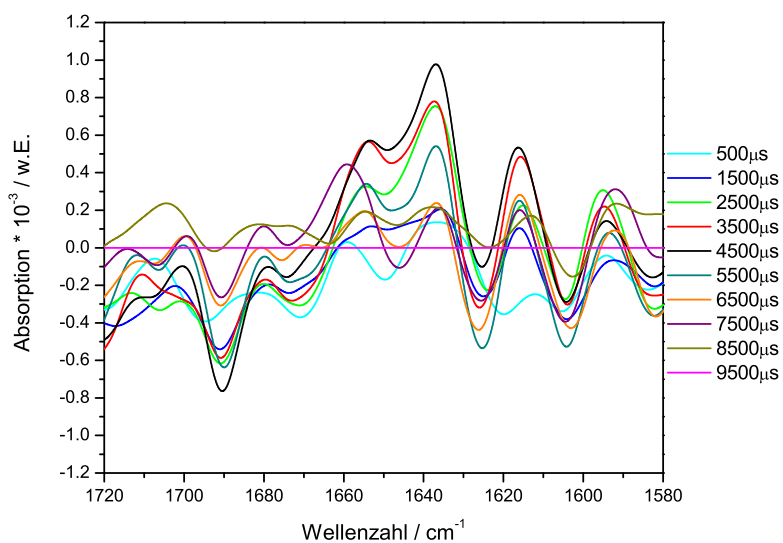


Abbildung 10.3.4: Zeitaufgelöste FTIR-Spektren mit einer Zeitauflösung von $\Delta t = 1000 \mu\text{s}$. Die Anregungsfrequenz ist 100 Hz.

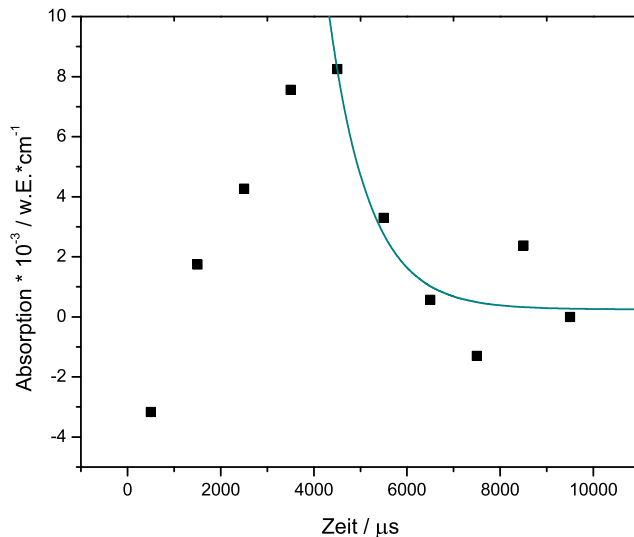


Abbildung 10.3.5: Peakfläche des Cu_A -Peaks bei 1650 cm^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit. Aufgrund der verrauschten Daten kann nur der oxidative Ast mit einer monoexponentiellen Funktion angefitet werden: es ergibt sich eine Zeitkonstante von $\tau = 854,7 \pm 467,5 \mu\text{s}$, das entspricht 1170 ± 640 Übergängen in einer Sekunde.

10.3 Kinetische Parameter der Oxidoreduktion des Cu_A - und des Häm a_3 -Zentrums

10.3.3 Hohe Anregungsfrequenz- 1 kHz

Für den Amid-I-Bereich gelingt es, auch in einem Experiment hoher Anregungsfrequenz, charakteristische Banden zu isolieren. Im hier gezeigten Experiment wird mit einer Frequenz von 1kHz angeregt. Die FTIR-Messung erfolgt im Step-Scan-Modus, wodurch theoretisch eine Zeitauflösung bis zu $\Delta t=5\text{ns}$ möglich ist. Durch die Limitierung eines schlechten SNR wird eine Zeitauflösung von $\Delta t=100\mu\text{s}$ gewählt.

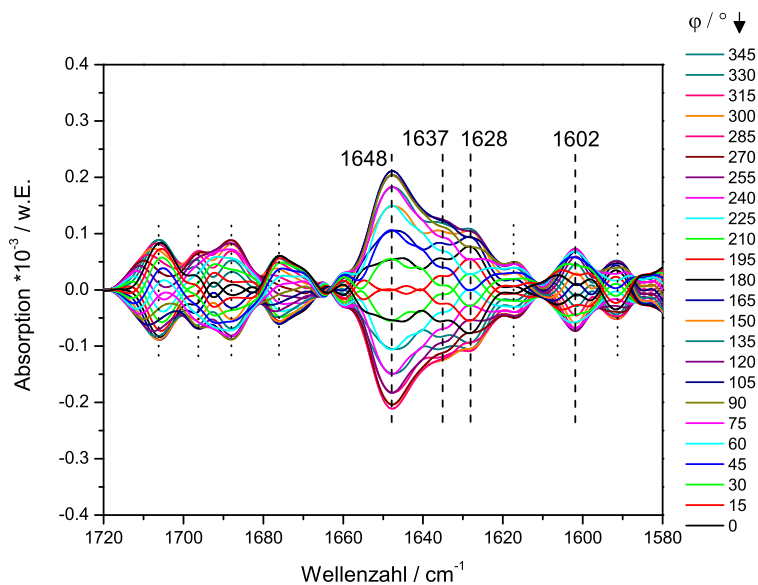


Abbildung 10.3.6: Phasenaufgelöste FTIR-Spektren mit einer Winkelauflösung von $\Delta\varphi = 15^\circ$. Die Lage der im Fit verwendeten Banden ist eingezeichnet, die deutlichsten Banden sind mit Lage des Zentrums eingetragen.

Phasenanalyse In Abbildung 10.3.6 sind zunächst wieder die phasenaufgelösten Spektren mit einer Phasenauflösung von $\Delta\varphi = 15^\circ$ aufgetragen. Der Phasenwinkel kann hier nur noch für das Cu_A -Zentrum berechnet werden und ist in Tabelle 10.3.3 eingetragen. Es ist zu beobachten, dass der Phasenwinkel mit $-72,3^\circ$ weit im negativen Bereich liegt, dass der entsprechende Redox-Prozess also auf primäre Prozesse folgt. Dies ist gut durch das „electronic wiring“ durch

Zeitaufgelöste ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung der Kinetik des direkten Elektronentransfers in der CcO

Bande / cm^{-1}	$\varphi/^\circ$	Zugeordnetes Redoxzentrum
1648	-72,3	Cu_A

Tabelle 10.3.3: Phasenverschiebung φ für die Cu_A -Bande bei 1648 cm^{-1} in Abbildung 10.3.6. Die Phasenverschiebung bewegt sich weit im negativen Bereich, was darauf schließen lässt, dass der betreffende Prozess auf primäre Prozesse folgt. In diesem Fall ist dies das „wiring“ des Elektrons über die Ankergruppe bis zum Cu_A -Zentrum.

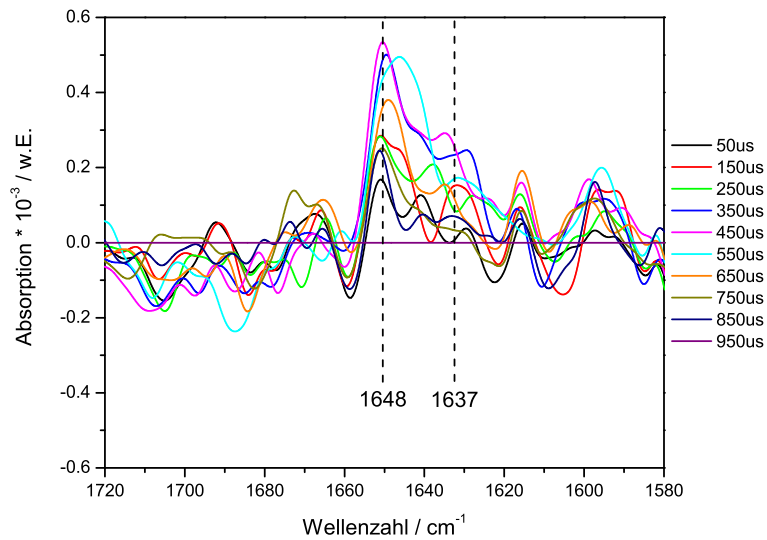
die Spacergruppe, den Ni-Komplex und den Anker sowie den weiteren Weg, den ein Elektron im Protein bis zum Cu_A -Zentrum nehmen muss, zu erklären. Die Bande bei 1637 cm^{-1} kann durch Moden antiparalleler β -Faltblätter erklärt werden, die sich in der CcO in Untereinheit II zwischen Histidin-Anker und Cu_A -Zentrum befinden. Die Phasenverschiebung ist hier mit $69,7^\circ$ etwas geringer als für das darauf folgende Cu_A .

Zeitkonstante des Cu_A -Zentrums In Abbildung 10.3.7 (a) sind die zeitaufgelösten Spektren des Experimentes aufgetragen. In (b) ist die Peakfläche der Cu_A -Bande bei 1648 cm^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Die Rückreaktion setzt nicht ab der Hälfte der Periode ein, sondern erst später, wodurch die starke Phasenverschiebung zustande kommt. Für die Reduktion ergibt sich eine Zeitkonstante von $\tau = 331,1 \pm 165,6\ \mu s$, dies entspricht 3020 ± 1510 Übergängen pro Sekunde. Für die Oxidation ergibt sich eine Zeitkonstante von $\tau = 205,3 \pm 72,9\ \mu s$, dies entspricht 4870 ± 1730 Übergängen pro Sekunde. Als gemittelte Zeitkonstante für das Cu_A erhält man so $268,2 \pm 119,3\ \mu s$, dies entspricht 3945 ± 1620 Übergängen pro Sekunde.

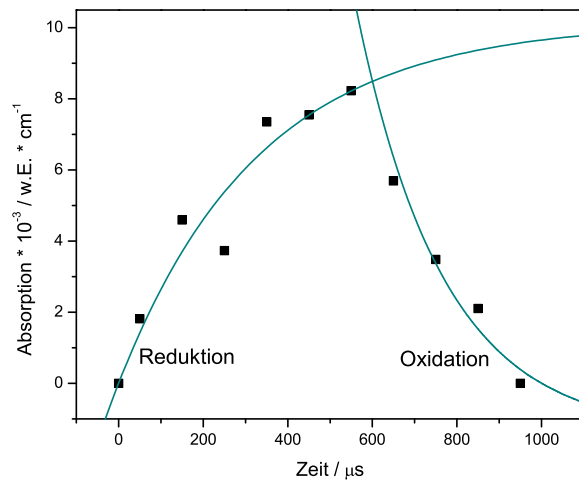
Man erkennt, dass die Exponentialfunktionen bei der Anregungsfrequenz von 1 kHz nicht in Sättigung gehen. Dies und die starke Phaseverschiebung weisen darauf hin, dass die Oxidoreduktion des Cu_A mit einer etwas langsameren Anregungsfrequenz noch besser aufgelöst werden kann.

Die weiteren angefitteten Banden liefern bei einer detaillierten Analyse keine aussagekräftigen Ergebnisse, weswegen darauf an dieser Stelle nicht näher eingegangen wird.

10.3 Kinetische Parameter der Oxidoreduktion des Cu_A - und des Häm a_3 -Zentrums



(a)



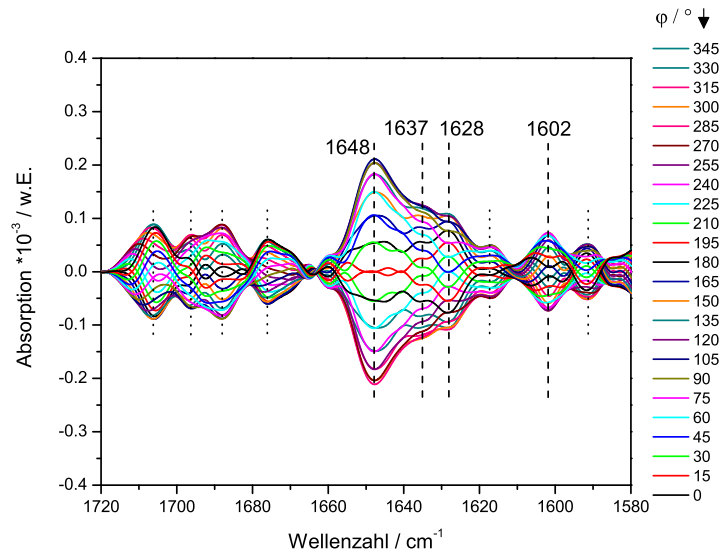
(b)

Abbildung 10.3.7: (a) Zeitaufgelöste FTIR-Spektren mit einer Zeitauflösung von $\Delta t=100\mu\text{s}$. (b) Peakfläche der Cu_A -Bande bei 1648 cm^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit. Deutlich ist die Asymmetrie zwischen Reduktion und Oxidation zu erkennen. Die Oxidation setzt nicht nach der halben Periode ein, sondern erst bei etwa 600 bis $650\mu\text{s}$, wodurch auch die Phasenverschiebung von $-72,3^\circ$ zustande kommt.

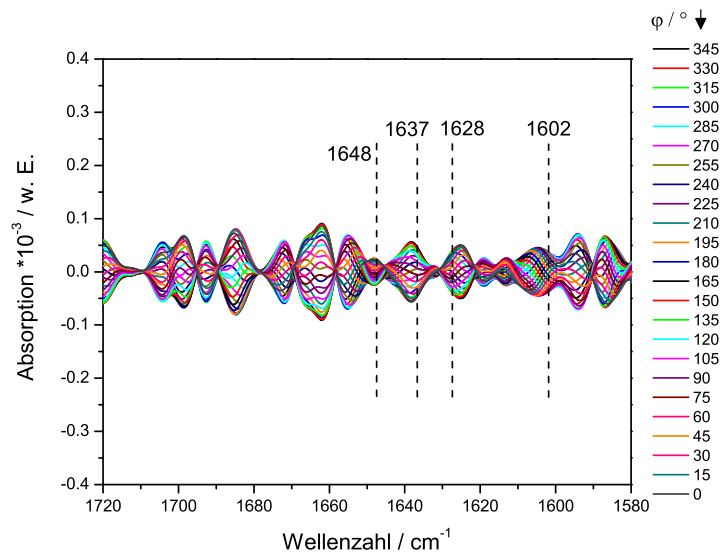
10.4 Ausschluss unspezifischer Banden durch ein Vergleichsexperiment mit CcO in der Down-Konfiguration

In einem Vergleichsexperiment kann gezeigt werden, dass die Banden, die im Versuch des vergangenen Abschnitts analysiert wurden, tatsächlich mit dem direkten Elektronentransfer in Zusammenhang stehen. Für diesen Test wird die CcO in der Down-Konfiguration immobilisiert, d.h. mit der Cytochrom *c*-Bindungsstelle zur Elektrode hin orientiert. Unter denselben Versuchsbedingungen wie für das zeitaufgelöste Experiment des vorhergehenden Abschnitts (s. Abschnitt 10.3.3) wird die Probe mit einer Anregungsfrequenz von 1kHz moduliert. Wie in Abbildung 10.4.1 (b) zu sehen ist, lassen sich in diesem Fall keine charakteristischen Banden identifizieren, die sich Redoxzentren zuordnen lassen. Zum Vergleich sind in Abbildung 10.4.1 (a) nochmals die entsprechenden Spektren mit der Probe in der Down-Konfiguration abgebildet. In (b) sind auch die Positionen der Banden aus (a) markiert. Es treten aber lediglich unspezifische schwache Banden bei anderen Wellenzahlen auf, die sich nicht zuordnen lassen.

10.4 Ausschluss unspezifischer Banden durch ein Vergleichsexperiment mit CcO in der Down-Konfiguration



(a)



(b)

Abbildung 10.4.1: (a) Vergleichsexperiment: (a) Phasenaufgelöste ATR-FTIR-Spektren von CcO mit der Cc-Bindungsstelle zur Elektrode hin orientiert, die Anregungsfrequenz ist 1kHz. Die Winkelauflösung beträgt $\Delta\varphi=15^\circ$; (b) das gleiche Experiment, aber mit CcO mit der Cc-Bindungsstelle von der Elektrode weg orientiert.

10.5 Messung unter aeroben Bedingungen

In einem ersten Versuch mit Sauerstoff können bei einer Anregungsfrequenz von 5kHz Änderungen im Absorptionsspektrum bei 1407 cm^{-1} nachgewiesen werden. Nach Tabelle D.3.1 kann diese Bande Konformationsänderungen in Zusammenhang mit der Oxidoreduktion des Cu_A -Zentrums zugeordnet werden. In Abbildung 10.5.1 sind die phasenaufgelösten Spektren der Messung zu sehen. In Abbildung 10.5.2 (a) sind die zeitaufgelösten Spektren dieser Messung, in Abbildung 10.5.2 (b) ist die Peakhöhe des Peaks bei 1407 cm^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Aufgrund des schlechten SNR können keine Peaks an die zeitaufgelösten Spektren angefitet werden, weswegen die Peakhöhe und nicht die Peakfläche analysiert wird. Durch Anfitzen monoexponentialer Kurven erhält man für den reduktiven Ast eine Zeitkonstante von $11,7 \pm 5,5\ \mu\text{s}$, was einem Umsatz von $k_s=85'270 \pm 40'280\ \text{/s}$ entspricht. Für den oxidativen Ast erhält man eine Zeitkonstante von $60,7 \pm 29\ \mu\text{s}$, was einem Umsatz von $k_s=16'470 \pm 7'880\ \text{/s}$ entspricht.

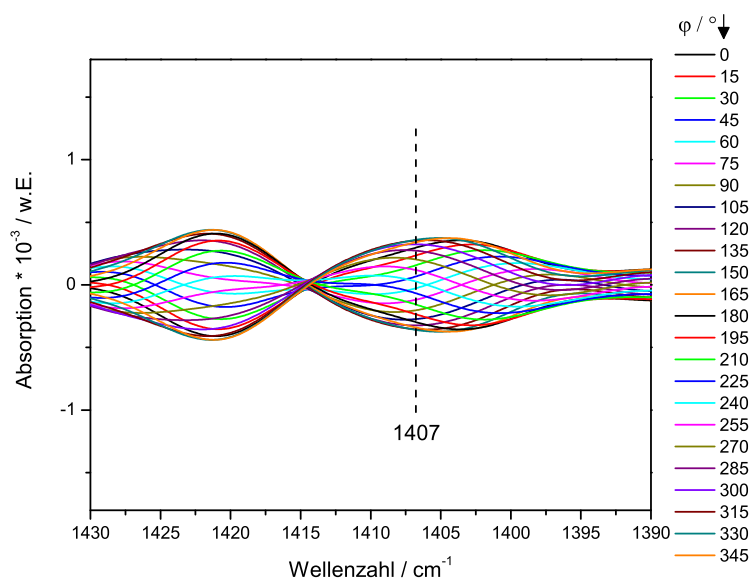
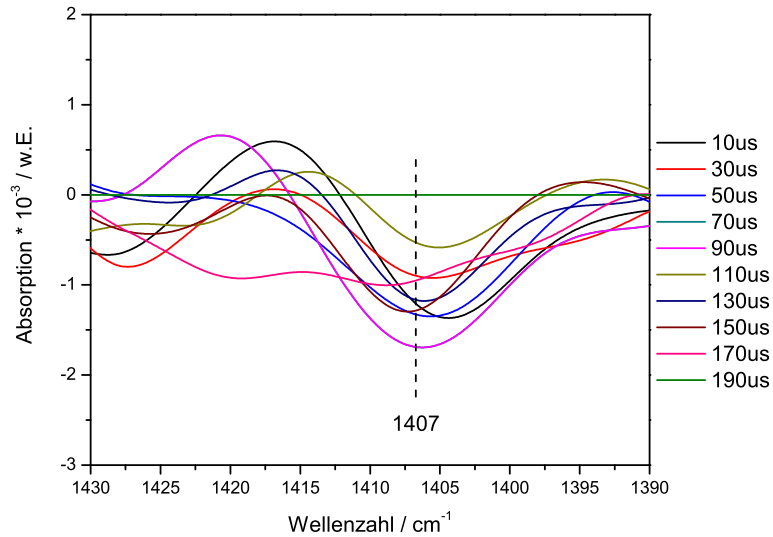
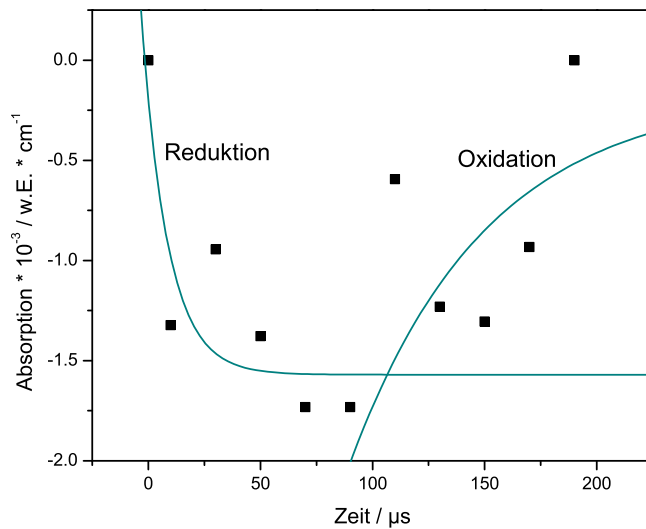


Abbildung 10.5.1: Phasenaufgelöste IR-Spektren mit einer Winkelauflösung von $\Delta\varphi=15^\circ$. Die Cu_A -Bande bei 1407 cm^{-1} wird im Folgenden analysiert.

10.5 Messung unter aeroben Bedingungen



(a)



(b)

Abbildung 10.5.2: (a) Zeitaufgelöste FTIR-Spektren mit einer Zeitauflösung von $\Delta t=20\mu\text{s}$. Die Anregungsfrequenz beträgt 5 kHz. (b) Peakhöhe der Cu_A-Bande in Abhängigkeit von der Zeit. Trotz des schlechten SNR können dreiparametrische Exponentialfunktionen angefitet werden.

Diskussion von Abschnitt 10.5

Die im aeroben Fall gemessenen Zeitkonstanten liegen mit $k_s=85'270/s$ (Reduktion) bzw. $k_s=16'470/s$ (Oxidation) deutlich über den Werten, die man im anaeroben Fall erhält. Hier liegt die Zeitkonstante für das Cu_A -Zentrum bei $k_s=3020/s$ (Reduktion) bzw. $k_s=4870/s$ (Oxidation) (s. Abschnitt 10.3.3). Dieses Ergebnis bestätigt die Erwartung, dass der direkte Elektronentransfer in der Gegenwart von Sauerstoff wesentlich schneller abläuft als ohne Sauerstoff. O_2 wird durch die Elektronen reduziert, wodurch direkt weitere Elektronen nachfließen können. Wird die Elektrode auf positives Potential zurückgeschaltet, so fließen keine Elektronen zurück, sondern die Redoxzentren bleiben nach Abgabe eines bzw. mehrerer Elektronen oxidiert. Im anaeroben Fall hingegen fließen die Elektronen von den Redoxzentren zurück zur Elektrode.

Die hier präsentierte Messung unter anaeroben Bedingungen ist als erster Test zu verstehen, da das SNR hoch ist und eine detaillierte Auswertung mit einem Fit an die Banden nicht möglich ist. Dennoch lässt die Messung darauf schließen, dass auch im aeroben Fall zeitaufgelöste Messungen der Ladungstransferprozesse in der CcO möglich sind.

10.6 Zusammenfassung von Abschnitt 10

Mit Hilfe potentiostatischer Messungen konnte für drei der vier Redoxzentren der Cytochrom c Oxidase, dem Cu_A, dem Häm a und dem Häm a₃ gezeigt werden, dass sie durch Verändern des Elektrodenpotentials oxidiert bzw. reduziert werden können.

Der direkte Elektronentransfer konnte mit Hilfe von oberflächenverstärkter ATR-FTIR-Spektroskopie zeitaufgelöst nachgewiesen werden. Gemessen wurden dabei Konformationsänderungen umgebender Gruppen, dies können sowohl einzelne Aminosäuren als auch Sekundärstrukturen sein.

Die phasensensitive Detektion wurde als wichtiges Hilfsmittel eingesetzt, um Rauschen zu unterdrücken und die entscheidenden zeitabhängigen Banden isolieren zu können. Erst dadurch konnten charakteristische Banden identifiziert werden, die anschließend auch in den zeitaufgelösten Spektren angefitet wurden. Im Bereich der Amid-I-Bande konnten auf diese Weise mehrere Banden isoliert und zeitaufgelöst angefitet werden. Im letzten Schritt wurden die zeitaufgelösten Peakhöhen der Banden wiederum durch monoexponentiale dreiparametrische Funktionen angefitet und so Zeit- bzw. Geschwindigkeitskonstanten gewonnen. Dies ist für zwei der vier Redoxzentren in der Cytochrom c Oxidase gelungen: für das Cu_A-Zentrum als das erste Zentrum, welches von den Elektronen des direkten ET erreicht wird, konnte in einer Messung mit vergleichsweise gutem SNR eine Zeitkonstante von $\tau = 331,1 \pm 165,6 \mu\text{s}$ für die Reduktion ermittelt werden, dies entspricht $k_s = 3020 \pm 1510$ Übergängen pro Sekunde. Für die Oxidation wurde eine Zeitkonstante von $\tau = 205,3 \pm 72,9 \mu\text{s}$ ermittelt, dies entspricht $k_s = 4870 \pm 1730$ Übergängen pro Sekunde. Dieser Wert korrespondiert sehr gut mit der Geschwindigkeitskonstanten, die in [15] durch elektrochemische Messungen für den gleichen Prozess ermittelt wurde: $k_s = 4130 \pm 390/\text{s}$. Das zweite Redoxzentrum, für das eine Zeit- bzw. Geschwindigkeitskonstante ermittelt werden konnte, ist das Häm a₃-Zentrum. Hier wurde für die Reduktion eine Zeitkonstante von $\tau = 176,1 \pm 29,8 \text{ ms}$ ermittelt, dies entspricht $k_s = 5,7 \pm 0,1$ Übergängen pro Sekunde. Für die Oxidation ergab sich eine Zeitkonstante von $\tau = 72,5 \pm 12,2 \text{ ms}$, dies entspricht $k_s = 13,8 \pm 2,3$ Übergängen pro Sekunde. In [15] wurde für das dritte Redoxzentrum, welches das Häm a₃-Zentrum sein muss, eine Geschwindigkeitskonstante von $k_s = 68 \pm 8/\text{s}$ ermittelt, was um den Faktor 5-12 von den hier gemessenen Werten abweicht. Für die Abweichung kann hier zunächst keine

Zeitaufgelöste ATR-FTIR-Spektroskopie zur Untersuchung der Kinetik des direkten Elektronentransfers in der CcO

Erklärung gegeben werden, es muss aber darauf hingewiesen werden, dass sowohl in [15] als auch in dieser Arbeit keine kinetische Analyse der Prozesse der Redoxzentren untereinander gemacht wurde, sondern pauschal der Transfer von der Elektrode zum Redoxzentrum und zurück betrachtet wurde. Hierdurch ergeben sich sicherlich Abweichungen zwischen einer elektrochemischen Analyse wie in [15] und einer spektroskopischen Analyse wie in dieser Arbeit. Mit den Methoden Infrarotspektroskopie und Raman-Spektroskopie lassen sich die Redoxprozesse der CcO sehr gut verfolgen, wobei die Infrarotspektroskopie in dieser Arbeit eingesetzt werden konnte, um die bisherigen Erkenntnisse durch Raman-Spektroskopie und Elektrochemie entscheidend zu erweitern.

Über den anaeroben Fall hinaus konnten mit ersten Versuchen auch Ladungstransferprozesse im aeroben Fall nachgewiesen werden. Hier wurden deutlich höhere Zeitkonstanten für das Cu_A -Zentrum ermittelt: für die Reduktion wurden $11,7 \pm 5,5 \mu\text{s}$ gemessen, was einer Geschwindigkeitskonstanten von $k_s = 85'270 \pm 40'280/\text{s}$ entspricht. Für die Oxidation wurden $\tau = 60,7 \pm 29 \mu\text{s}$ gemessen, dies entspricht einer Geschwindigkeitskonstanten von $k_s = 16'470 \pm 7'880/\text{s}$. Dieses Ergebnis bestätigt die Erwartung, dass der direkte Elektronentransfer in der Gegenwart von Sauerstoff wesentlich schneller abläuft als ohne Sauerstoff. O_2 wird durch die Elektronen reduziert, wodurch direkt weitere Elektronen nachfließen können.

Kapitel 11

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Als Vorbereitung für FTIR-Experimente an monomolekularen Schichten musste im Rahmen dieser Dissertation zunächst ein geeigneter Messaufbau entwickelt und realisiert werden. Als Technik wurde die ATR-Konfiguration gewählt, da sich hiermit ultradünne Schichten gut untersuchen lassen. Die Präparation einer Goldschicht mit Nanopartikel-Struktur auf dem ATR-Kristall wurde optimiert und der Verstärkungseffekt für diesen speziellen Aufbau wurde bestimmt. Die Komponenten für die elektrochemische Steuerung von potentiostatischen und von zeitaufgelösten Experimenten wurden in den ATR-FTIR-Messaufbau integriert. Hierzu mussten auch spezielle elektronische Anforderungen berücksichtigt werden (s. Abschnitt 8.2).

Bevor der Messaufbau für die Experimente an der Cytochrom c Oxidase eingesetzt wurde, konnte anhand zweier anderer Systeme gezeigt werden, dass der Aufbau sehr gut funktioniert, um monomolekulare Schichten zu untersuchen. Der neue ATR-Aufbau mit der Möglichkeit der Goldbeschichtung ermöglicht Experimente an allen künstlichen Membransystem auf Goldoberflächen.

Zum einen wurde die Absorption von Wasser durch die Oligoethylenglycol-Spacer-Region des DPTL untersucht, welches für viele Präparationen verwendet wird (s. Abschnitt 9.2); zum anderen konnte die Aktivität eines in-situ exprimierten Geruchsrezeptors auf einer peptidgestützten Membran durch Nachweis der Ligandenbindung gezeigt werden (s. Abschnitt 9.3). Diese beiden Beispiele zeigen,

dass die Möglichkeit oberflächenverstärkter Infrarotspektroskopie in der ATR-Konfiguration für Untersuchungen an künstlichen Membransystemen generell vielversprechend ist.

Die in vorher publizierten Arbeiten bereits vorgestellte Methode der Immobilisierung der Cytochrom c Oxidase (CcO) mit anschließender in-situ-Rekonstitution in eine Lipid-Membran [14] konnte im Hinblick auf die maximale Aktivität des Enzyms optimiert werden.

Als entscheidender Schritt stellte sich die Verdünnung der Spacerregion heraus. Die Aktivität des Proteins ist sehr stark von der Oberflächenbelegungs-dichte abhängig. Bei zu hoher Belegungs-dichte verliert das Protein seine Funktionalität, der wahrscheinliche Grund hierfür liegt in elektrostatischen Wechselwirkungen. Bei zu niedriger Belegungs-dichte hingegen gelingt die Ausbildung der Membran nur unzureichend, da die Protein-Moleküle zu weit voneinander entfernt sind. Der Mittelweg wurde mit einer Mischung der Komplex-bildenden Spacergruppen TP-NTA mit Verdünnergruppen TP im Verhältnis 60:40 Mol% gefunden. Für dieses Ergebnis wurde eine umfangreiche Studie durchgeführt (s. Abschnitt 9.4).

Die Untersuchungen an der CcO wurden in Abwesenheit von Sauerstoff durchgeführt, um die elektrochemische Reduktion der Redoxzentren mit Infrarotspektroskopie nachweisen zu können. Diese Studien sind Voraussetzung für spätere Untersuchungen in Gegenwart von Sauerstoff. Aktivität des Enzyms in Gegenwart von Sauerstoff ist bereits in früheren Studien [15] und auch in einem ersten Testversuch mit Infrarotspektroskopie nachgewiesen worden.

Dadurch lassen sich die Ladungstransferprozesse des direkten Elektronentransfers definiert isolieren und die Belegungs-dichte lässt sich zu $5,9 \text{ nMol/cm}^2$ berechnen. In [15] wurden auch Versuche unter aeroben Bedingungen gemacht. Die katalytische Verstärkung ließ aber eine quantitative Analyse bis jetzt nur bedingt zu. Ladungstransferprozesse mit entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten konnten noch nicht aufgeklärt werden, weswegen auch in dieser Arbeit ohne Sauerstoff gearbeitet wurde.

Das optimierte ptBLM-System konnte auch erfolgreich für die Immobilisierung der CcO in der umgekehrten Orientierung, d.h. mit der Cytochrom-c-Bindungsstelle

von der Elektrode weg orientiert, eingesetzt werden. Auch in dieser Orientierung ist das Protein aktiv, es lässt sich mit Cytochrom *c* aktivieren (s. Abschnitt 9.6).

Nach der Optimierung des ptBLM-Systems konnte gezeigt werden, dass diese Technologie auch mit anderen Membranproteinen als der CcO funktioniert. Als Beispiel hierfür wurde das bakterielle photosynthetische Reaktionszentrum benutzt. (s. Abschnitt 9.7). Bei den Messungen, die äquivalent zur CcO durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass hinsichtlich der Anbindungskinetik ähnliche Zeitkonstanten gelten. Eine Aktivität des Reaktionszentrums konnte durch Lichtaktivierung nachgewiesen werden. Dieser wichtige Nachweis lässt den Schluss zu, dass das ptBLM-System grundsätzlich für Membranproteine einsetzbar ist und die Vorzüge dieses Systems in Zukunft auch für andere Systeme nutzbar sein werden.

Mit Raman-Untersuchungen von Friedrich et al. [15] konnten in Form einer potentiostatischen Titration verschiedene Redoxzustände der Häm-Zentren der CcO nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt, ist die Raman-Spektroskopie sehr spezifisch für die Redoxzustände der Häme, sie spricht aber nicht auf die Kupfer-Zentren an. Mit Infrarotspektroskopie lassen sich Änderungen der Redoxzustände über Konformationsänderungen der sie umgebenden Polypeptidgruppen und Umlagerungen der Aminosäurereste detektieren. So konnte die potentiostatische Titration der beiden Häme und des Cu_A -Zentrums vom vollständig reduzierten zum vollständig oxidierten Zustand mit FTIR-Spektroskopie verfolgt werden (s. Abschnitt 10.1).

Der Nachweis der elektrochemischen Reduktion des Cu_A -Zentrums durch Infrarotspektroskopie ist von großer Bedeutung für die Erklärung des Phänomens der Potenzialverschiebung der elektrochemischen Reduktion des Cu_A gegenüber seinem Standardpotenzial [15]. Mit der Infrarotspektroskopie konnte einwandfrei geklärt werden, dass die Elektronen zuerst auf das Cu_A und von dort aus auf die Häme übertragen werden.

Das Ziel dieser Dissertation waren zeitaufgelöste FTIR-Messungen des direkten Elektronentransfers in die Cytochrom *c* Oxidase. Diese konnten erfolgreich durch-

geführt werden.

Insbesondere im Bereich der Amid-I-Bande wurden etliche Peaks identifiziert, die sich mit dem Redoxzustand eines Redoxzentrums ändern. Eine Cu_A -Bande bei 1650 cm^{-1} konnte in mehreren Experimenten beobachtet werden und liefert eine Geschwindigkeitskonstante von $k_s=4870/\text{s}$. Dieser Wert liegt in derselben Größenordnung wie der durch elektrochemische Messungen [15] ermittelte Wert von $4130/\text{s}$.

Eine Bande bei 1635 cm^{-1} , welche dem Häm a_3 -Zentrum zugeordnet wird, liefert für dieses Zentrum eine Geschwindigkeitskonstante von $13,8/\text{s}$. Dieser Wert weicht von dem von Friedrich et al. gemessenen Wert von $68/\text{s}$ ab, er liegt aber in einer ähnlichen Größenordnung. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz kann damit gegeben werden, dass die hier gemachten Untersuchungen auf einer rauen Oberfläche durchgeführt wurden. Im Gegensatz dazu wurden die elektrochemischen Messungen in [15] auf ultraflachem TSG-Gold durchgeführt. Die hierdurch höhere Ordnung kann zu einer höheren Geschwindigkeitskonstante führen, was sich bei dem der Elektrode am nächsten liegenden Redoxzentrum (Cu_A) noch nicht bemerkbar macht.

Zeitaufgelöste Messungen von Ladungstransferprozessen in der Cytochrom c Oxidase waren bisher nur mit Proteoliposomen möglich, z.B. durch photoinduzierten Ladungstransfer, gemessene intramolekulare Elektronentransferraten vom Cu_A -Zentrum zum Häm a lieferten ebenfalls Werte von $k_s>4000/\text{s}$ [30]. Der große Unterschied zu den dort vorgestellten Messungen besteht darin, dass mittels Photodissoziation nur eine einzige Anregung möglich ist. Mit der in vorliegender Arbeit benutzten Technik des direkten Elektronentransfers von einer Elektrode in das Protein kann der Elektronentransfer ständig ohne Wartezeit wiederholt werden, so dass tausende Anregungen pro Sekunde möglich sind. Diese völlig neue Technik ermöglicht zeitaufgelöste FTIR-Messungen des Elektronentransfers, da erst durch das wiederholte Durchführen des Zyklus genug Absorptionssignal gesammelt werden kann, um die Daten quantitativ auswerten zu können.

Eine weitere Errungenschaft in der vorliegenden Arbeit ist die Anwendung von phasensensitiver Detektion (PSD) auf zeitaufgelöste FTIR-Daten von Proben, die elektrochemisch mit einer Zeitauflösung herunter bis zu $20\text{ }\mu\text{s}$ moduliert werden.

PSD wurde bisher nur bei Modulationen in der Größenordnung von Sekunden eingesetzt, z.B. bei Temperatur-modulierten Messungen an Proteinen [152] oder bei elektrischer Modulation zur Untersuchung von Lipiden [153]. Die mit Hilfe der PSD gewonnenen phasenaufgelösten Infrarotspektren sind in der vorliegenden Arbeit von entscheidender Bedeutung. Die quantitative Auswertung der zeitaufgelösten Spektren wurde erst mit den in den phasenaufgelösten Spektren gewonnenen Informationen wie Bandenlage und Halbwertsbreite der Peaks möglich.

Kapitel 12

Ausblick

In weiteren Experimenten sollte daran gearbeitet werden, das SNR weiter zu verbessern. So können die Zeitkonstanten für die Oxidoreduktion der Redoxzentren der CcO mit einem kleineren Fehler bestimmt werden.

Ein möglicher Ansatzpunkt ist es, den Oberflächenverstärkungseffekt systematisch zu untersuchen, denn der Effekt, welcher in Abschnitt 9.1 ermittelt wurde, ist etwa um den Faktor fünf kleiner, als in den in Abschnitt 4.3.3 präsentierten Arbeiten. Die Präparation der Goldschicht selbst ist diffizil und gelingt oft nur schlecht, so dass auch dies ein Grund wäre, andere Verfahren für verstärkende Schichten zu untersuchen.

Möglich ist auch die Kombination zweier in dieser Arbeit präsentierter Techniken: oberflächenverstärkte Infrarot-Spektroskopie und Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie. Die Anregung propagierender Plasmonen für einen engen Wellenzahlbereich- im Bereich der Amid-I-Bande- ist ein Ansatz, das Signal besser auszunutzen und somit das SNR zu erhöhen.

In dieser Arbeit wurde aus den genannten Gründen fast ausschließlich sauerstofffrei gearbeitet. Um tiefere Erkenntnisse für den katalytischen Zyklus der CcO zu gewinnen, wird es wichtig sein, zeitaufgelöste Messungen auch mit Sauerstoff durchzuführen. Insbesondere der oxidative Teil des katalytischen Zyklus im Hinblick auf die Prozesse im aktiven Häm- a_3 -Cu_B-Zentrum (s. Abschnitt 3.4.3) ist teilweise noch unverstanden und kann so untersucht werden. Um das zu vereinfachen, sollte mit definierten, kleinen Sauerstoff-Konzentrationen begonnen werden.

In [16] (Diplomarbeit von M. Plum) wurden erste Messungen mit einer Mutante der CcO präsentiert. Bei der Mutante N139C wurde eine Aminosäure am Anfang des Protonen-D-Kanals gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht. Es zeigt sich, dass das Pumpen von Protonen durch diese Mutation stark verlangsamt ist, das Enzym ist aber dennoch aktiv und zeigt Elektronentransfer. Infrarot-Messungen an dieser und an anderen Mutanten werden ebenfalls neue Erkenntnisse zum katalytischen Zyklus liefern. Gerade ein verlangsamter Protonentransfer könnte Untersuchungen der Prozesse im aktiven Zentrum einfacher machen. Das ptBLM-System bietet sich hierfür an.

Wie in der vorliegenden Arbeit anhand des bakteriellen photosynthetischen Reaktionszentrums gezeigt wurde, können auch andere Membranproteine als die CcO im ptBLM-System immobilisiert werden. Damit wird deutlich, dass die Methode prinzipiell für Membranproteine anwendbar ist, an die ein Histidin-Anker angefügt werden kann. Da die ptBLM-Methode für die CcO neue Erkenntnisse brachte, wird das System auch für andere Proteine wichtige Experimente möglich machen. Die Vorzüge des Systems- definierte Orientierung, reproduzierbare definierte Anregung durch die Elektrode, hohe Belegungsdichte- werden auch für die Erforschung anderer Membranproteine sehr nutzbringend sein.

Teil IV

Anhang

Anhang A

Datenaufnahme und Auswertung

In diesem Abschnitt werden die wichtigsten Schritte bei der Datenaufnahme und der Auswertung gezeigt. Es soll so zumindest in groben Zügen nachvollzogen werden können, wie die dargestellten Daten im Abschnitt „Ergebnisse und Diskussionen“ aufgenommen und verarbeitet wurden.

A.1 SPR-Messungen

A.1.1 Datenaufnahme

Die SPR-Messungen werden mit der Software „Wasplas“ [154] gesteuert. Das Programm ermöglicht die Abtastung definierter Winkelbereiche mit vorgegebener Auflösung. In Abbildung A.1.1 ist das Eingabefenster für die abzufahrenden Winkelbereiche dargestellt. Die Intervalle 2 und 4 werden mit einer zehnmal besseren Auflösung ($0,05^\circ$) abgetastet als die übrigen Bereiche, da hier die Bereiche der Totalreflexion bzw. des Plasmonenminimums liegen, die für die spätere Simulation von besonderer Bedeutung sind.

A.1.2 Auswertung der SPR-Daten mit Winspall

Die SPR-Messungen wurden mit dem Programm „Winspall“, Version 3.01 Release 0.1, Autor: Jürgen Worm, 2006 [141] ausgewertet. Das Programm wird benutzt, um Plasmonen zu simulieren. In den Simulationsalgorithmus integriert sind die Fresnel-Gleichungen.

Für die Simulation werden die (soweit bekannten) Schichtdicken und die optischen

The screenshot shows the following input fields in the Wasplas software:

- start angle [°] : 40
- 1. Interval [°] : 0.7
- 1. Angle [°] : 47
- 2. Interval [°] : 0.05
- 2. Angle [°] : 48.5
- 3. Interval [°] : 0.5
- 3. Angle [°] : 55
- 4. Interval [°] : 0.05
- 4. Angle [°] : 59
- 5. Interval [°] : 0.5
- End angle [°] : 65
- Delay time [sec.] : 0.01
- max. Intensity [V] : 0.1

Abbildung A.1.1: Eingabefenster der Software Wasplas. Es können verschiedene Winkelbereiche mit definierten Winkelauflösungen vorgegeben werden.

Parameter Brechungsindex bzw. die komplexe elektrische Suszeptibilität der verschiedenen Schichten eingegeben. Die nicht bekannten Größen werden dann entweder manuell oder durch ein automatisiertes Iterationsverfahren des Programms so lange verändert, bis das simulierte Plasmon im Rahmen der Fehlertoleranz mit dem gemessenen übereinstimmt. Die Schichten im Beispiel (Abbildung A.1.3) sind als unterste und als oberste Schichten das Glasprisma und die Pufferlösung, deren Dicken im Programm mit null angegeben werden müssen (obwohl sie im Vergleich mit den anderen Schichten sehr groß sind), die Goldschicht, die Spacer-Region und die Proteinschicht. Am zweckmäßigsten simuliert man zunächst das Plasmon vor der Protein-Anbindung. Hier liegen nur vier Schichten vor und man kann sich auf die Anpassung der Golddicke konzentrieren, da die Dicke der Spacer-Region in der Regel bekannt ist- im Falle unseres ptBLM-Systems sind dies 1,4nm. Kommt dann eine weitere Schicht hinzu, wird durch Simulation des neuen- um einen Winkel $\Delta\theta$ verschobenen- Plasmons direkt die Dicke der neuen Schicht bestimmt.

A.1 SPR-Messungen

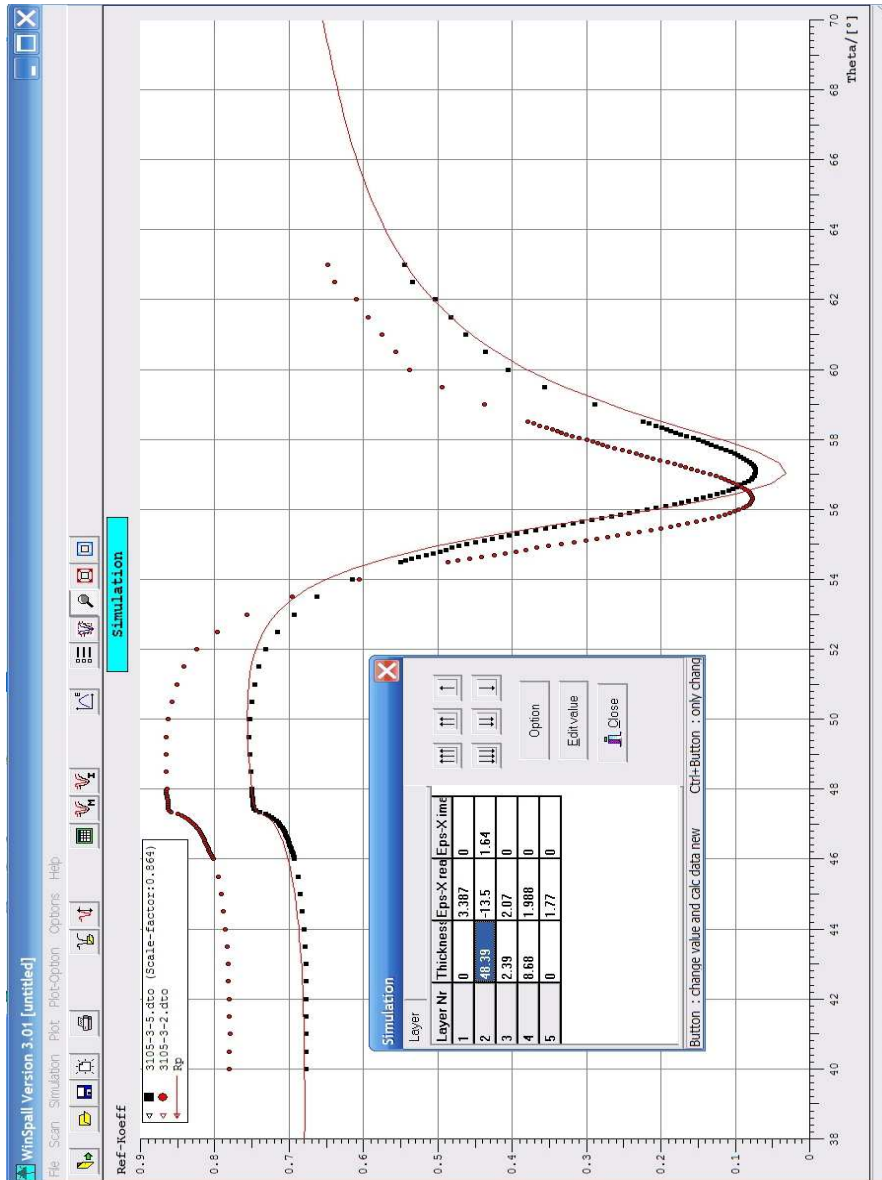


Abbildung A.1.2: Arbeitsoberfläche des Programms WinSpall. Die durch Datenpunkte dargestellten Kurven sind gemessene Plasmonen. Die durchgezogene Kurve ist das Ergebnis der manuellen Simulation, deren Parameter in der Abbildung zu sehen sind und deren Bedeutung in Abbildung A.1.3 erklärt ist.

Layer Nr	Thickness	Eps-X rea	Eps-X ime
1	0	3.387	0
2	48.39	-13.5	1.64
3	2.39	2.07	0
4	8.68	1.988	0
5	0	1.77	0

d ε' ε''

Button : change value and calc data new Ctrl+Button : only chang

Abbildung A.1.3: Parameter der Winspall-Simulation. Die fünf Zeilen zeigen die Parameter Optische Dicke d sowie Real- und Imaginärteil ϵ' und ϵ'' der fünf aufeinander folgenden Schichten.

A.2 Elektrochemische Experimente

A.2.1 Elektrochemische Impedanzmessungen und Auswertungen

Die Messungen der Elektrochemischen Impedanz (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS) werden auf einem Autolab-Potentiostaten PGSTAT302 (Metrohm, Filderstadt) mit der Software FRA (Frequency Response Analyzer, Eco Chemie B.V.; Utrecht, The Netherlands) aufgenommen. Der Frequenz-Messbereich wird von 50 kHz bis 3 mHz gewählt.

Die Daten werden mit einem Fitalgorithmus des Programms FRA angefitet. Das Programm fragt ab, welcher Ersatzschaltkreis als Grundlage für den Fit am ehesten in Frage kommt. Es können Ohmschen Widerstände, Kapazitäten, CPEs (constant Phase Element) in verschiedenen Anordnungen gewählt werden. So ist es möglich, die in Abschnitt 5.1.4 erläuterten Ersatzschaltkreise zu simulieren. In Abbildung A.2.1 ist eine EIS-Messung dargestellt. Die Daten wurden mit einem Ohmschen Widerstand, einem RC-Glied und einem RQ-Glied (Q steht für CPE) angefitet. Es handelt sich bei dem vermessenen System um eine ptBLM-Schicht (s. Abschnitt 7.3), welche durch die Parallelschaltung aus einem Ohmschen Widerstand und einem CPE repräsentiert wird. Der Submembranraum, bestehend aus Anker- und Verdünnermolekülen, wird durch ein RC-Glied repräsentiert.

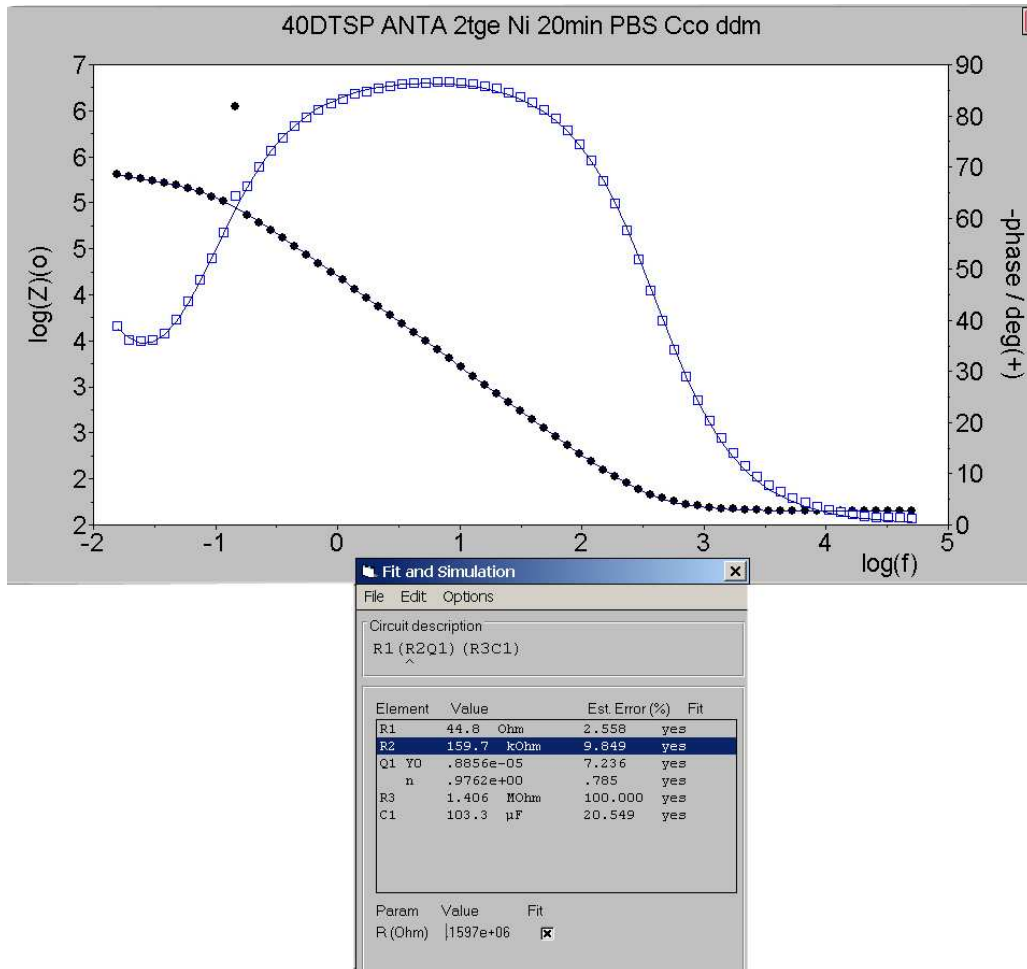


Abbildung A.2.1: Elektrische Impedanzmessung mit der Software FRA und Fit der Daten mit einem Ersatzschaltbild bestehend aus einem Ohmschen Widerstand, der die Lösung repräsentiert, einem RC-Glied für den Submembranraum (R3C1) und einem RQ-Glied, welches die Protein-Membran-Schicht repräsentiert (Ohmscher Widerstand mit parallelem CPE).

A.2 Elektrochemische Experimente

A.2.2 Cyclovoltammetrie-Messungen und Auswertungen

Die Cyclovoltammetrie-Messungen werden ebenfalls mit dem Autolab-Potentiostaten aufgenommen. Die Software ist GPES (General Purpose Electrochemical System 4.9, Eco Chemie B.V.; Utrecht, The Netherlands). Die standardmäßig eingestellte Scan-Rate für die meisten Experimente beträgt 100mV/s, der Spannungsbereich -700 bis +300mV vs. Ag/AgCl. Die Basislinienkorrektur und die Peakintegration zur Ermittlung der übertragenen Spannung erfolgt mit einem implementierten Algorithmus.

A.2.3 Elektrochemische Steuerung von Redoxprozessen

Für eine elektrochemische Steuerung von Redoxprozessen wird der Autolab-Potentiostat benutzt, um ein konstantes bzw. definiert veränderliches Potenzial auf die Arbeitselektrode des spektroelektrochemischen Aufbaus zu geben. Hierzu bietet die Software GPES (s. vergangener Unterabschnitt) die Möglichkeit, den Potentiostaten extern zu triggern. Dies geschieht entweder durch einen Funktionsgenerator oder durch TTL-Pulse des FTIR-Spektrometers (s. Abschnitt 8.2 und entsprechende Abbildungen).

A.3 Infrarotspektroskopische Experimente

A.3.1 Datenaufnahme stationärer und zeitaufgelöster Spektren

FTIR-Experimente werden auf den FTIR-Spektrometern IFS 66 und VERTEX 70 (Bruker Optik, Karlsruhe) durchgeführt. Die dazugehörige Software ist OPUS. Stationäre Spektren werden standardmäßig mit einer Auflösung $\Delta\tilde{\nu}=4\text{ cm}^{-1}$ und in einem Bereich von 4000 bis 1000 cm^{-1} aufgenommen. Im Step-Scan-Modus kommen Bandpassfilter zum Einsatz. Zeitaufgelöste Messungen werden im Rapid-Scan- oder im Step-Scan-Modus durchgeführt. Die höchste Zeitauflösung für Rapid-Scan-Messungen liegt bei 78ms, im Step-Scan-Modus bei 5ns (in vorliegender Arbeit war die höchste verwendete Zeitauflösung $20\text{ }\mu\text{s}$.)

A.3.2 Die OPUS-Fitroutine

Die im Programm OPUS implementierte Fitroutine ermöglicht das Anfitten beliebig vieler Absorptionsbanden eines Spektrums mit Gauß-, Lorentz- oder Voigtprofil (Faltung aus Gauß- und Lorentzkurve). Die Fitparameter können abgespeichert werden und für Spektrum gleicher Bandenlagen erneut verwendet werden, um z.B. für Spektren einer zeitaufgelösten Messung konsistente Fitparameter verwenden zu können.

A.3 Infrarotspektroskopische Experimente

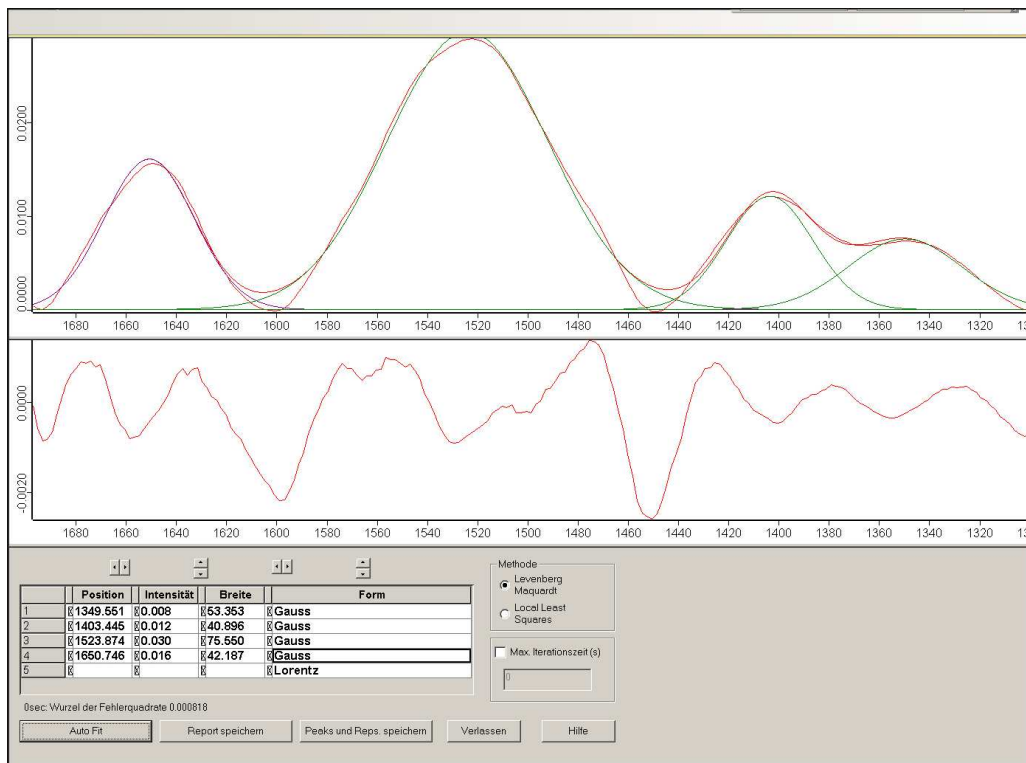


Abbildung A.3.1: Fitroutine der OPUS-Software. Es können beliebig viele Banden gleichzeitig angefitet werden. Die möglichen Bandenformen sind Gauß-förmige Banden, Lorentz- oder Voigt-Kurven.

A.3.3 Das PSD-Makro

Das Makro zur Berechnung von phasenaufgelösten (PSD-)Spektren aus zeitaufgelösten Spektren `psd_loop` wurde von D. Baurecht und U.P. Fringeli (Universität Wien) entwickelt [95]. Es wird in die OPUS-Software implementiert. Mit Hilfe des Makros lassen sich die Absorptionsspektren $\vec{A}_k^{\phi_k^{PSD}}(\tilde{\nu})$ für jeden Phasenwinkel ϕ und die Phasenverschiebung φ einer Absorptionsbande bzgl. des Anregungssignals berechnen. Das Eingabefenster für die Parameter ist in Abbildung A.3.2 dargestellt.

A.3 Infrarotspektroskopische Experimente

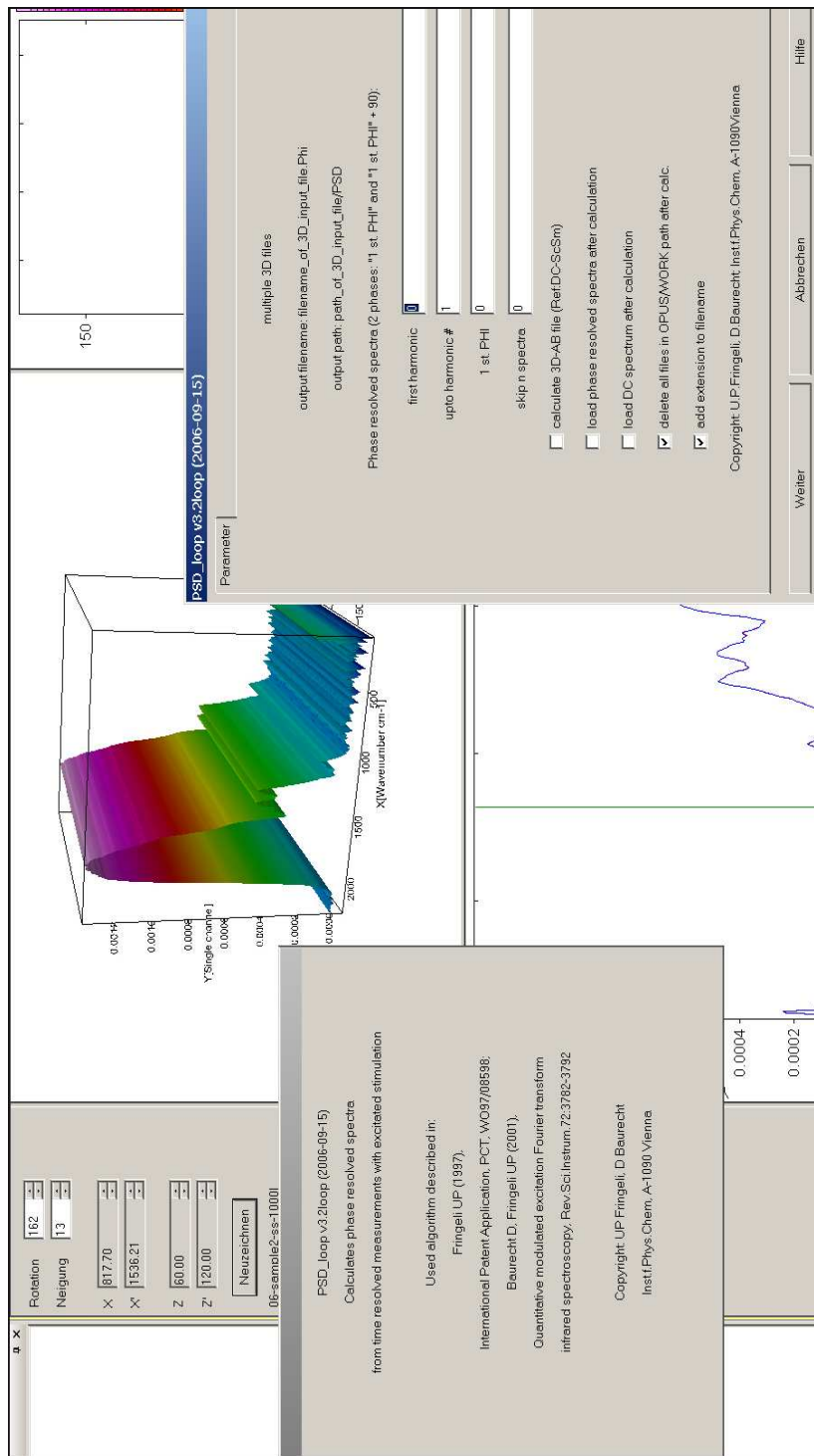


Abbildung A.3.2: Eingabefenster für das PSD-Makro. In dieser Arbeit wird nur mit der Grundfrequenz gearbeitet (die Anzahl der harmonischen Obertöne ist ein Eingabeparameter).

Anhang B

Material

B.1 Geräte

- Aufdampfanlage: fl 400 mit auto 306 [Edwards]
- Blaspistole: Elektra Beckum BP 200 [Metabo]
- Chopper: 197 [EG&G]
- FTIR-Spektrometer IFS 66 und VERTEX 70 [Bruker Optik, Karlsruhe]
- Fünf-Phasen-Schrittmotor [Huber]
- Funktionsgenerator: DS345 30 MHz [Stanford Research]
- Galvanisierungseinheit [Labor Elektronik]
- Laser ($\lambda=632,8$ nm): 1105P [JDS Uniphase]
- Lock-In Verstärker: 5210 [EG&G]
- Magnetrührer: MR 3001 K [Heidolph]
- Monochromator: LaserspecIII [Spectrolab]
- Oszilloskop: LC334AM 500 Mhz [Le Croy]
- pH-Meter: pH-Meter 766 Calimatic [Knick]
- Polarisator [Fa. Halle]

- Poliermaschine: Phoenix 4000 [Buehler]
- Potentiostat: Autolab PGSTAT302, ausgestattet mit einem FRA2-Modul für Impedanzmessungen, einem ECD-Modul-Verstärker für niedrige Ströme, einem ADC750 Modul für schnelle Scanmessungen und einem SCAN-GEN-Modul für analoge Potenzial-Scans [Eco Chemie, B.V.]
- Rasterkraftmikroskop: AFM (Atomic Force Microscope) Dimension 3100 CL Olympus (Messungen auf trockenen Oberflächen) und AFM Multimode Tuna/Torsion (Messungen in Flüssigkeit) [Veeco]
- Reagenzglasschüttler: Reax 2000 [Heidolph Instruments GmbH]
- Ultraschallbad: Super RK510 H [Sonorex]
- Zweikreisgoniometer [Huber]

B.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammen hauptsächlich von den Firmen Sigma-Aldrich und Fluka Chemie GmbH. Der Hersteller steht in der folgenden Auflistung in eckigen Klammern. An erster Stelle steht die an manchen Stellen der Diplomarbeit verwendete Abkürzung, gefolgt von dem Namen der Substanz:

- Ammoniak (NH_3): 32% ig [WTL Laborbedarf GmbH]
- Ammoniumchlorid (NH_4Cl) [Sigma]
- Ammoniumfluorid (NH_4F) [Sigma]
- Ammoniumperoxodisulfat ($\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$) [Fluka]
- ANTA: $\text{N}_{\alpha'},\text{N}_{\alpha''}$ -bis(carboxymethyl)-L-lysine ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$) [Fluka]
- DDM: n-Dodecyl- β -D-maltoside [Sigma]
- DiphyPC: 1,2 Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine [Avanti Polar Lipids, Inc]
- DMSO: Dimethylsulfoxid ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$) [Acros Organics]

B.2 Chemikalien

- DPTL: 2,3-Di-O-phytanyl-sn-glycerin-1-tetraethylenglycol-D,L- α -liponsäureester [Synthese im MPI für Polymerforschung]
- DTP: Dithiopropionat ($C_6H_{10}O_4S_2$) [Sigma]
- DTSP: Dithiosuccinimidylpropionat ($C_{14}H_{16}O_8S_2$) [Sigma]
- Essigsäure ($C_2H_4O_2$) [Fluka]
- Fluorwasserstoffsäure (HF) 40% [Sigma]
- Glucose Oxidase: Type VII von *Aspergillus niger* (Schwarzschimmel) [Sigma]
- Glukose: D-(+)-Glucose ($C_6H_{12}O_6$) [Sigma]
- Gold: Feingoldgranulat 99,99% [ESG Edelmetall Service GmbH&Co. K]
- Kaliumchlorid (KCl) [Sigma]
- Kaliumcarbonat (K_2CO_3) [Sigma]
- Kaliumhydroxid (KOH) 85% [WTL Laborbedarf]
- Kaliumphosphat (K_2HPO_4) [Fluka]
- Katalase (Rinderleber) [Sigma]
- Natriumchloroaurat ($Na(AuCl_4)$) [Sigma]
- Natriumdithionit ($Na_2S_2O_4$) [Fluka]
- Natriumsulfit (Na_2SO_3)
- Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_3$) [Sigma]
- Nickel(II)-chlorid Hexahydrat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$) [Fluka]
- Platindraht: $\varnothing = 0,1$ mm und Reinheitsgrad: 99,99% [Chempur]
- Salzsäure (HCl) 37% [WTL Laborbedarf]
- Schwefelsäure (H_2SO_4) [Acros Organics]

- Silberdraht: $\varnothing = 1,0$ mm und Reinheitsgrad 99,99% [Chempur]
- Stickstoff (flüssig) und Dewargefäß für Transport [Air Liquide]
- Stickstoff mit Reinheitsgrad 4 [Westfalen AG in Münster]
- Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 35% [Sigma]

B.3 Weitere Materialien

- Argon mit Reinheitsgrad 6.0 [Westfalen AG in Münster]
- ATR-Kristalle aus Silizium [Korth Kristalle GmbH]
- Biobeads SM-2 adsorbent 20-50 mesh [Bio-Rad Laboratories, Inc.]
- Cytochrom c: Rinderherz [Sigma]
- Cytochrom c Oxidase (Rhodobacter sphaeroides, Wild Type und Mutante N139C, Histidin-Anker an Untereinheit II, „Down-Konfiguration“) wurde uns von Prof. Robert B. Gennis, Department of Biochemistry, University of Illinois, zur Verfügung gestellt.
- Cytochrom-c-Oxidase (Paracoccus denitrificans, Histidin-Anker an Untereinheit I, „Up-Konfiguration“) wurde uns von Prof. Bernd Ludwig, Universität Frankfurt, zur Verfügung gestellt.
- Hellmanex II [Hellma]
- Immersionsöl [Cargille Laboratories, Inc.]
- Kleber: TSG EPO-TEK, 2 Komponentenkleber (Verhältnis 1:10) [Polytec]
- Objektträger: BK7 mit Brechungsindex $n=1,5$ [Menzel-Gläser]
- Objektträger: LaSFN-9 mit Brechungsindex $n=1,845$ [Hellma]
- O-Ringe, Viton [Rheinwerkzeug]
- Plexiglas [Cadillac Plastic's]
- Poliermittel (Diamantpaste, MetaDi Supreme 9 μm , 3 μm , 1 μm) [Buehler]

B.3 Weitere Materialien

- Poliertücher (TexMet P, VerduTex, MicroCloth) [Buehler]
- Prisma LaSFN-9 mit Brechungsindex $n=1,845$ [Spindler&Hoyer]
- Reaktionszentrum, bakterielles photosynthetisches (Rhodobacter sphaeroides, Histidin-Anker an Untereinheit H), wurde uns von Prof. S. Boxer, Stanford, zur Verfügung gestellt.
- Sephadex G-25 Medium PD-10 Entsalzungssäule [GE Healthcare]
- Siliziumwafer-Spezialanfertigung [CrysTec GmbH]
- Teflon [Cadillac Plastic's]

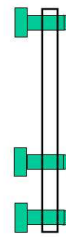
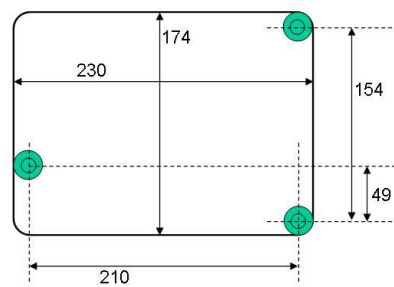
Anhang C

Konstruktionszeichnungen

C.1 ATR-FTIR-Probenkammer und Messzelle

C.1.1 Probenkammereinsatz

Dieser Probenkammereinsatz wurde für das FTIR-Spektrometer IFS 66 (Bruker) für Messungen bei der Gruppe von Prof. Fringeli, Wien, konstruiert. Durch geringfügige Modifizierungen konnte er auch in das neue FTIR-Spektrometer VERTEX 70 (Bruker) in Mainz verwendet werden. Die in den Zeichnungen gezeigte Messzelle wurde in späteren Messungen durch eine kleinere Messzelle ersetzt (s. C.1.2). Die Konstruktionszeichnungen für den Probenkammereinsatz sind in den Abbildungen C.1.1 bis C.1.2 gezeigt.



**Unterbau
SCHRITT 1**

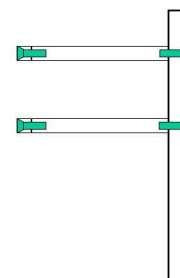
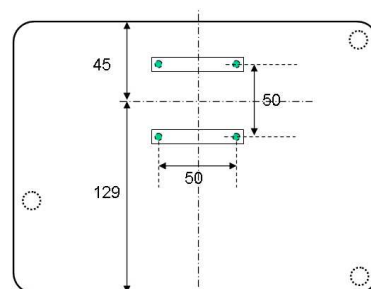


Kugelschrauben M10

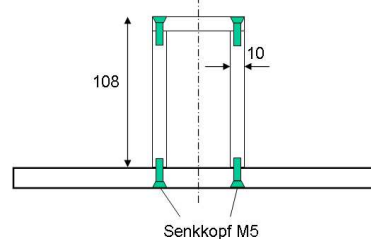
Material der Platte: Aluminium
Stärke der Platte: 12 mm

Weitere erforderliche
Bohrungen in der Platte
und Aufbauten:
Siehe nächste Seite

(a)



**Unterbau
SCHRITT 2**

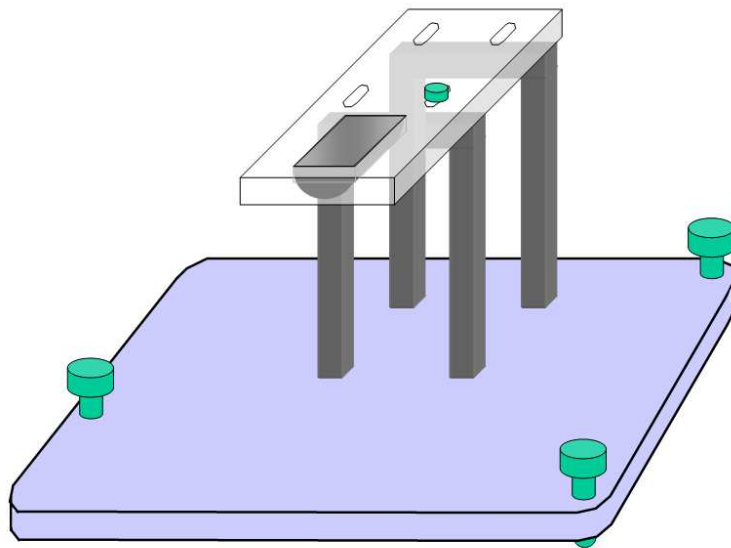


Senkkopf M5

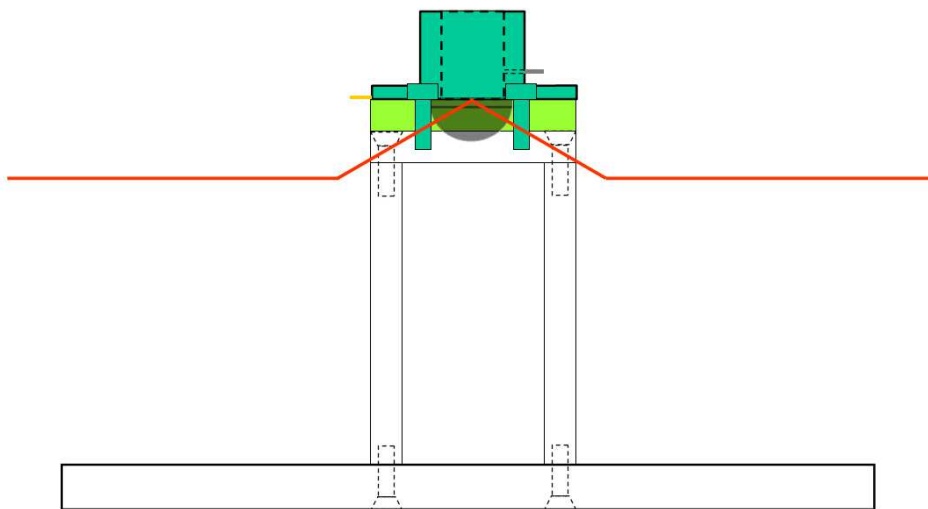
(b)

Abbildung C.1.1: Konstruktionszeichnungen des Probenkammereinsatzes für das FTIR-Spektrometer IFS 66 bzw VERTEX 70 (beide Bruker); (a) Bodenplatte mit Kugelschrauben zur Höhenverstellung und Justage; (b) Aufsatz zum Festschrauben der Messzelle.

C.1 ATR-FTIR-Probenkammer und Messzelle



(a)



(b)

Abbildung C.1.2: Konstruktionszeichnungen des Probenkammereinsatzes für das FTIR-Spektrometer IFS 66 bzw. VERTEX 70 (beide Bruker); (a) 3D-Ansicht mit eingelegtem ATR-Kristall; (b) Vorderansicht mit aufgeschraubter Zelle und Strahlengang.

C.1.2 Messzelle

Eine Messzelle für ATR-FTIR-Messungen wurde entwickelt, mit der die folgenden Anforderungen realisiert wurden:

- Kleines Zellvolumen von 1,2 ml. Offen kann mit Flüssigkeitsmengen von $V > 300 \mu\text{l}$ gearbeitet werden, was eine erhebliche Einsparung von Chemikalien bzw. Proteinen bedeutet (das Volumen der SPR-Zelle beträgt beispielsweise in jedem Fall 1 ml).
- Sichere Kontaktierung der Arbeitselektrode (Goldoberfläche des Kristalls) durch einen Block mit Goldfuß
- Verteilung des Anpressdrucks der Dichtung auf eine Viton-Platte (im Gegensatz zu einem O-Ring, der erfahrungsgemäß die Goldkontaktierung abklemmt).
- Optimierte Positionierung der Zelle im Probenraum.

Die Konstruktionszeichnungen für die Halterungen der Messzelle und für die Messzelle sind in den Abbildungen C.1.3 bis C.1.6 gezeigt.

C.1 ATR-FTIR-Probenkammer und Messzelle

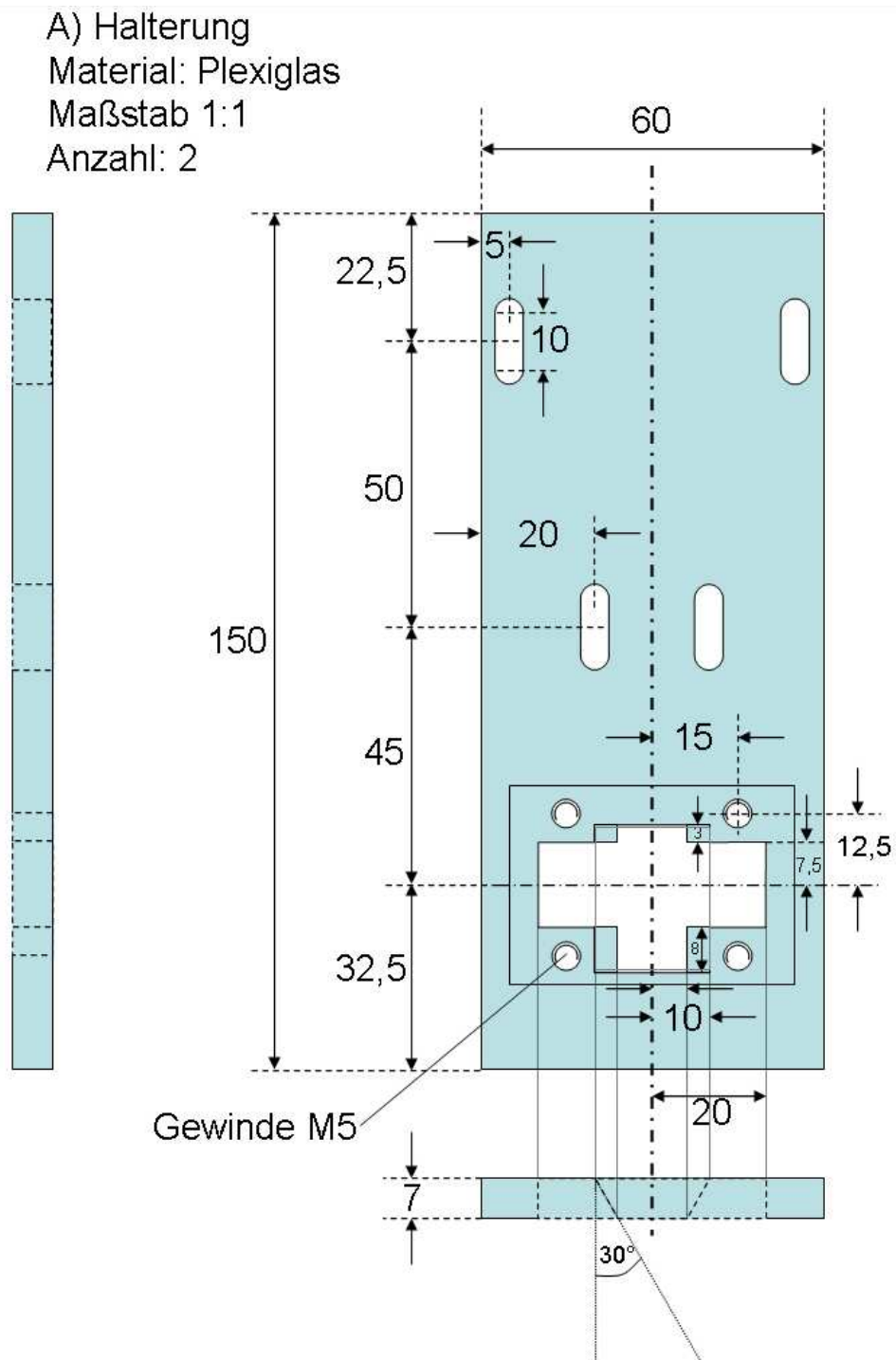
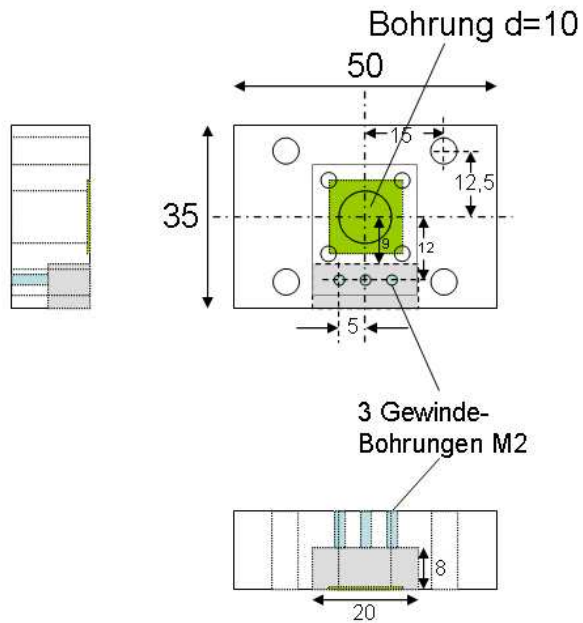
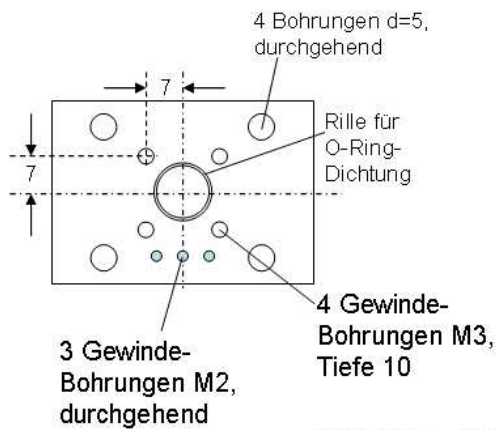


Abbildung C.1.3: Halterung für die Messzelle.

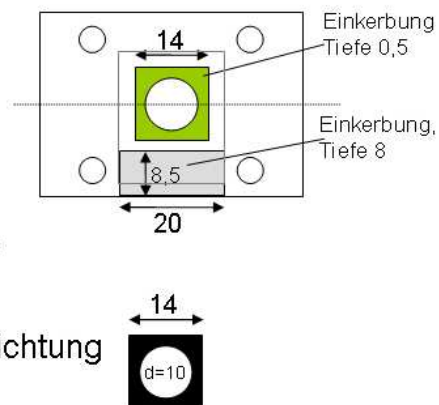
B) Zelle
 Material: Teflon
 Maßstab 1:1
 Anzahl: 2



Oberseite (Blick von oben)



Unterseite (Blick von oben)

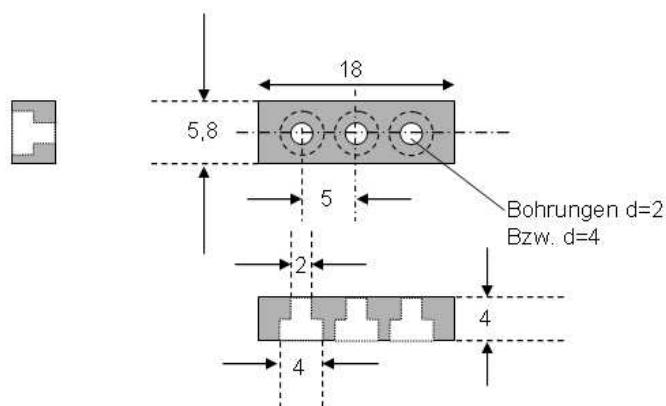


B2) Viton-Dichtung
 Stärke 1

Abbildung C.1.4: Die Messzelle mit einem Volumen von 1,2 ml.

C) Block mit Goldfuß
Material: Al, (Viton, Gold, s. spezielle
Beschriftung)
Maßstab 2:1

1)



2)

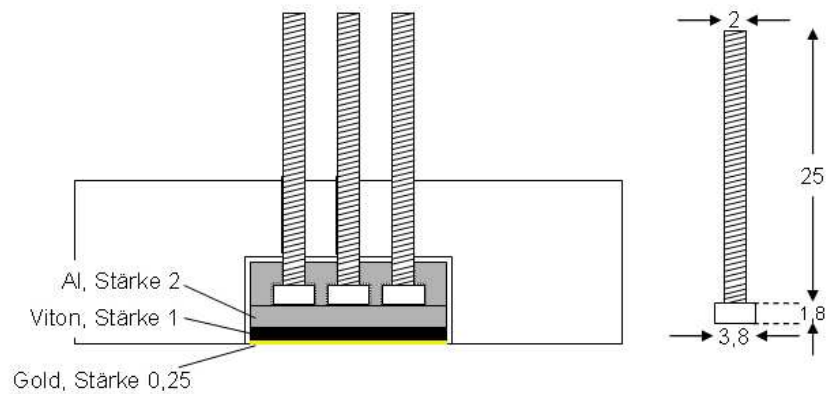
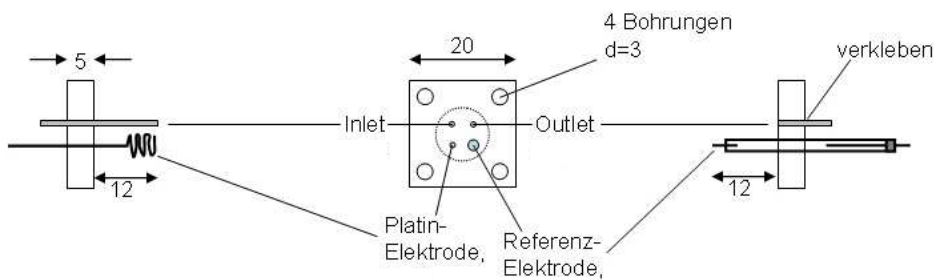


Abbildung C.1.5: Der Block mit Goldfuß zur Kontaktierung der Goldoberfläche.

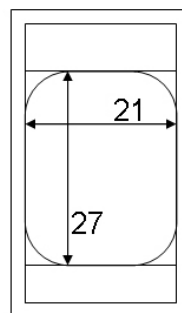
D) Deckel
 Material: Plexiglas
 Maßstab 1:1



Inlet und Outlet: Metallhülsen

E) Beschichtungswanne
 Material: Teflon, mit Stahlfuß

s. Vorlage, jedoch Dimensionen an die neuen Kristalle angepaßt



Zeichnung nicht maßstäblich!

Abbildung C.1.6: (D) Der Deckel der Messzelle, (E) Die Wanne für die Goldbeschichtung.

Anhang D

Tabellen

D.1 Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Symbol
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Tabelle D.1.1: Die 20 kanonischen Aminosäuren mit zugehöriger Drei-Buchstaben-Abkürzung und Ein-Buchstaben-Code.

D.2 Infrarotabsorption durch Methylgruppen

Schwingung	Bandenlage / cm^{-1}
CH_3 , antisymmetrische Streckschwingung ($\tilde{\nu}_{as}$)	2956
CH_2 , antisymmetrische Streckschwingung ($\tilde{\nu}_{as}$)	2920
CH_3 , symmetrische Streckschwingung ($\tilde{\nu}_s$)	2870
CH_2 , symmetrische Streckschwingung ($\tilde{\nu}_s$)	2850
C=O, Streckschwingung	1730
CH_2 , Scherenschwingung	1463

Tabelle D.2.1: Absorptionsbanden der Methylgruppen, nach [134] (Auswahl).

D.3 Zuordnung von IR-Banden zur Oxidoreduktion der einzelnen Redoxzentren der CcO

Tabelle D.3.1: Zuordnung von IR-Banden zur Oxidoreduktion der einzelnen Redoxzentren der CcO und vorläufige Zuordnung zu bestimmten Infrarot-Schwingungen [23]. Für die Zuordnung wurden Daten aus verschiedenen Quellen benutzt, diese sind jeweils angegeben.

Bandenlage/ cm ⁻¹	Redox- zentrum	Redox- zustand	Zuordnung der Bande (Absorber; Schwingung; zugeordnete Seitenkette)
3092	Cu _B	ox	OH, OH ⁻ ; $\nu(\text{OH})$; Cu _B , OH ⁻ Ligand / Y; $\nu(\text{OH})$; Y280 / H; $\nu(\text{NH})$; H326, H325 / (CH) Alkene; $\nu(\text{C}=\text{H})$; H326, H325, H276 W272, Y280
2876	Cu _B	ox	OH, OH ⁻ ; $\nu(\text{OH})$; Cu _B , OH ⁻ Ligand / Y; $\nu(\text{OH})$; Y280 / H; $\nu(\text{NH})$; H326, H325 / (CH) Alkane, $\nu(\text{CH})$; beliebiger Ligand / H ₃ O ⁺ ; $\nu_{as}(\text{OH})$; H ⁺ x (H ₂ O) _n , n=5 [29]
1746/1737	Häm a	ox/red	E, Glu-COOH; $\nu(\text{C}=\text{O})$; E278 [22]
1689	Cu _A	ox	Amid I, β -Faltblatt; $\nu(\text{C}=\text{O})$
1684	Cu _A	red	Amid I, β -Faltblatt; $\nu(\text{C}=\text{O})$
1674	Häm a ₃ , komplexe Bande	ox	R, Arg-H ₅ ⁺ ; $\nu_{as}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$; R473 [22] / Propionat; $\nu(\text{C}=\text{O})$ [25] / Formyl [24] / Amid I, Windungen; $\nu(\text{C}=\text{O})$
1661	Häm a	red	Amid I, α -Helix; $\nu(\text{C}=\text{O})$ / Amid I, Windungen; $\nu(\text{C}=\text{O})$
1655	Häm a ₃	ox	Amid I, α -Helix; $\nu(\text{C}=\text{O})$
1651	Cu _A	red	Amid I, α -Helix; $\nu(\text{C}=\text{O})$
1641	Häm a ₃	ox	Formyl; $\nu(\text{C}=\text{O})$ [27] / Amid I, β -Faltblatt; $\nu(\text{C}=\text{O})$

D.3 Zuordnung von IR-Banden zur Oxidoreduktion der einzelnen Redoxzentren der CcO

Bandenlage/ cm ⁻¹	Redox- zentrum	Redox- zustand	Zuordnung der Bande (Absorber; Schwingung; zugeordnete Seitenkette)
1630	Häm a ₃	red	R, Arg-H ₅ ⁺ ; $\nu_s(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$; R473 H, HisH ₂ ⁺ ; $\nu(\text{C}=\text{C})$; H403 [22] / Formyl [24] / Amid I, β -Faltblatt; $\nu(\text{C}=\text{O})$
1618	Häm a ₃	red	Y, Tyr-OH; $\nu(\text{CC})$ Ring, $\delta(\text{CH})$; Y280 / W; $\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{C}=\text{C})$; W272, W164 [22] / Vinyl; $\nu(\text{C}-\text{C})$ [26] / Amid I, β -Faltblatt; $\nu(\text{C}=\text{O})$
1603	Cu _A	red	Amid I, β -Faltblatt; $\nu(\text{C}=\text{O})$
1592	Cu _A	ox	H, HisH; $\nu(\text{C}=\text{C})$; H224, H181 / R, Arg-H ₅ ⁺ ; $\nu_{as}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$; R473 D, Asp-COO ⁻ ; $\nu_{as}(\text{COO}^-)$; D178 [22] /
1561	Häm a ₃	ox	W, Trp-NH; $\nu(\text{CC})$, $\delta(\text{CH})$; W164 [22] Propionat [25]
1546	Häm a	red	Häm, ν_{38y} [26]
1537	Häm a	ox	Propionat [25]
1526	Häm a ₃	red	Propionat / Häm; ν_{38s} / Häm; ν_{38y} [26]
1510	Cu _A	red	W, Trp-NH; $\nu(\text{CN})$, $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{NH})$; W121 [22]
1489	Cu _B	red	W; $\nu(\text{CC})$, $\delta(\text{CH})$; W272 H, HisH; $\nu(\text{C}=\text{N})$, $\delta(\text{CH})$; H325, H326 [22]
1483	Cu _B	ox	W, Trp-NH; $\nu(\text{CC})$, $\delta(\text{CH})$; W272 [22]
1473	Häm a ₃	red	F, $\delta_{as}(\text{CH}_3)$; F412 [22] / Häm; A _{1g} , ν_3 [24]
1468	Cu _A	ox	W, Trp-NH; $\delta(\text{CH})$, $\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CN})$; W121 [22]
1455	Cu _B	ox	H, His ⁻ ; H326, H325, H276 [28]
1431	Cu _A	ox	W, Trp-NH; $\delta(\text{CH})$, $\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CN})$; W121 / D, Asp-COOH; $\delta(\text{COH})$; D178 / E, Glu-COO ⁻ ; $\nu_s(\text{COO}^-)$; E218 [22]

Bandenlage/ cm ⁻¹	Redox- zentrum	Redox- zustand	Zuordnung der Bande (Absorber; Schwingung; zugeordnete Seitenkette)
1419	Cu _A	red	W, Trp-NH; $\delta(\text{NH})$, $\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CH})$; W121 / H, HisH; $\nu(\text{CN})$, $\delta(\text{NH})$, $\delta_s(\text{CH}_x)$; H181, H224 / D, Asp-COOH; $\delta(\text{COH})$; D178 [22]
1407	Cu _A	red	E, Glu-COO ⁻ ; $\nu_s(\text{COO}^-)$; E218 / D, Asp-COO ⁻ ; $\nu_s(\text{COO}^-)$; D178 / W, Trp-NH; $\nu(\text{CC})$, $\delta(\text{NH})$, $\delta(\text{CH})$; W121 [22]
1389	Häm a	ox	T, $\delta(\text{COH})$; $\delta(\text{CH})$; T50 / E, $\gamma_w(\text{CH}_2)$; E278 [22] / Propionat [25]
1354	Häm a ₃	red	W; $\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CN})$, $\delta(\text{CH})$; W164, W272 / Y; $\gamma_w(\text{CH}_2)$; Y280 [22] / A _{1g} , ν_4 [24]
1332	Cu _B	ox	W; $\gamma_w(\text{CH}_2)$; W272 / Y, Tyr-O ⁻ ; $\gamma_w(\text{CH}_2)$; Y280 / D, Asp-COOH; $\delta(\text{COH})$; D399 / T; $\delta(\text{COH})$, $\delta(\text{CH})$; T344 [22]
1321	Cu _B	red	W; $\delta(\text{CH})$; W272 / Y; $\delta(\text{CH}_2)$ (Endgruppe), $\nu(\text{CC})$, $\delta(\text{CH})$; Y280 / T; $\delta(\text{COH})$, $\delta(\text{CH})$; T344 / D, Asp-COOH; $\delta(\text{COH})$; D399 [22]
1308	Cu _B	ox	D, Asp-COOH; $\delta(\text{COH})$; 399 / W; $\nu(\text{CC})$; W272 / T; $\delta(\text{COH})$, $\delta(\text{CH})$; T344 / H, HisH; $\nu(\text{C=N})$, $\nu(\text{CN})$; H326, H325 [22]
1250	Cu _B	red	W; $\nu(\text{CC})$, $\delta(\text{CH})$, $\gamma(\text{CH}_2)$ (Endgruppe); W272 / T; $\delta(\text{COH})$, $\delta(\text{CH})$; T344 [22]
1151	Häm a	red	E, Glu-COOH; $\nu(\text{CO})$ E278 / H, His; $\nu(\text{CN})$, $\delta(\text{NH})$; H94, H413 [22]

D.3 Zuordnung von IR-Banden zur Oxidoreduktion der einzelnen Redoxzentren der CcO

Bandenlage/ cm ⁻¹	Redox- zentrum	Redox- zustand	Zuordnung der Bande (Absorber; Schwingung; zugeordnete Seitenkette)
1128	Cu _B	red	D, Asp-COOH; $\nu(\text{CO})$ D399 / W, Trp-NH; $\nu(\text{CC})$, $\delta(\text{CH})$; W272 / T; $\nu(\text{CO})$; T344 [22]
1105	Cu _B	ox	H; $\nu(\text{CN})$, $\delta(\text{CH})$; H326, H325, H276 / Y; $\gamma(\text{CH}_2)$ (Endgruppe); Y280 [22]
1032	Cu _B	ox	H ₂ O; H ⁺ -Oszillation; H ⁺ × (H ₂ O) _n , n=2,6 [29]

Anhang E

Glossar

- AFM: Atomic Force Microscopy (Rasterkraftmikroskopie)
- ADP: Adenosindiphosphat
- ATP: Adenosintriphosphat
- ATR: Attenuated total Reflection (abgeschwächte Totalreflexion)
- ANTA: Amino-nitrilotriacetic Acid (Amino-Nitrilotriessigsäure) bzw. $N_{\alpha'}$, $N_{\alpha''}$ -bis(carboxymethyl)-L-lysin
- Cc: Cytochrom c
- CcO: Cytochrom c Oxidase
- cmc: critical Micelle formation Concentration (kritische Mizellenkonzentration)
- CPE: Constant Phase Element (Konstantes Phasenelement)
- CV: Cyclic Voltammetry (Cyclovoltammetrie)
- Cyt c: Cytochrom c
- DDM: Dodecylmaltosid
- DMPE: Dimyristoylphosphatidylethanolamin
- DMSO: Dimethylsulfoxid

- DPhyPC: 1,2-Diphytanyl-sn-glycero-3-phosphocholin
- DPTL:
2,3-Di-O-phytanyl-sn-glycerin-1-tetraethylenglycol -D,L- α -liponsäureester
- DTP: Dithio-bis-Propionat
- DTSP: Dithio-bis-(Succinimidyl-Propionat)
- EDC: N-Dimethylaminopropyl-N'-Ethylcarbodiimid
- EIS: Electrical Impedance Spectroscopy (elektrische Impedanz-Spektroskopie)
- E_{app}^0 : Apparent standard potential (scheinbares Standardpotential)
- ET: Elektronentransfer
- FTIR-Spektroskopie: Fourier transformed infrared Spectroscopy (Fourier-transformierte Infrarot-Spektroskopie)
- GIR-FTIR-Spektroskopie: Grazing-Incidence-Reflection-FTIR-Spectroscopy (Reflexions-Absorptions-FTIR-Spektroskopie)
- GPCR: G-Protein-coupled Receptor (G-Protein gekoppelter Rezeptor)
- IR-: Infrarot-
- IRRAS infrared Reflection Absorption Spectroscopy (Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie)
- KCL: Kaliumchlorid
- MCT-Detektor: Mercurium-Cadmium-Tellurid-Detektor
- NADH: Nicotinamidadenindinukleotid
- NHE: Normal hydrogen Electrode (Normalwasserstoffelektrode)
- NHS: N-Hydroxysuccinimid
- NTA: Nitrilotriacetic Acid (Nitrilotriessigsäure)
- OEG: Oligoethylenglycol

-
- OR5: Odorant Receptor 5 (Geruchsrezeptor 5)
 - PBS: phosphate buffered Saline (Phosphatpuffer)
 - PC: Phosphatidylcholin
 - PDB: Protein Data Bank (Protein-Datenbank)
 - PEG: Polyethylenglycol
 - PM-IRRAS: Polarization Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy (polarisationsmodulierte Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie)
 - ptBLM: Protein-tethered Bilayer Lipid Membrane (Protein-verankerte Lipiddoppelschichtmembran)
 - RC: Reaction Center (Reaktionszentrum)
 - RMS: root mean square (quadratischer Mittelwert)
 - SAM: self assembled Monolayer (selbstorganisierende Monoschicht)
 - SE-FTIRS surface enhanced Fourier Transformed InfraRed Spectroscopy (oberflächenverstärkte Fourier-transformierte Infrarot-Spektroskopie)
 - SERRS: surface enhanced Resonance Raman spectroscopy (oberflächenverstärkte resonante Raman-Spektroskopie)
 - SNR: Signal to Noise Ratio (Signal-zu-Rausch-Verhältnis)
 - SPFS: Surface Plasmon Fluorescence Spectroscopy (Oberflächenplasmonen-Fluoreszenzspektroskopie)
 - SPR: Surface Plasmon Resonance (Oberflächenplasmonenresonanz)
 - tBLM: tethered Bilayer Lipid Membrane (verankerte Lipiddoppelschichtmembran)
 - TP : Thio-bis-Propionat
 - TSG: Template stripped Gold (von einer Matrize abgelöstes Gold)
 - TSP: Thio-bis-(Succinimidyl-Propionat)

- TTL: Transistor-Transistor-Logik
- VSV: Vesikuläre Stomatitis
- w.E.: willkürliche Einheiten
- XPS: X-ray Photoelectron Spectroscopy (Röntgeninduzierte Photoelektronenspektroskopie)

Abbildungsverzeichnis

3.1.1	(a) Die Phospholipidmembran. Phospholipide lagern sich durch hydrophobe Wechselwirkungen der Fettsäureketten zu einer Doppelschicht mit hydrophiler Außenseite an; (b) schematische Darstellung einer Zelle mit Zellmembran; (c) detaillierte Darstellung einer Zellmembran mit Membranproteinen und weiteren Bestandteilen [32].	11
3.1.2	(a) Eukaryotische Zelle mit ihren Bestandteilen: 1 Nukleolus, 2 Zellkern, 3 Ribosomen, 4 Vesikel, 5 Raues endoplasmatisches Reticulum (ER), 6 Golgi-Apparat, 7 Mikrotubuli, 8 Glattes ER, 9 Mitochondrien, 10 Lysosom, 11 Zytoplasma, 12 Mikrobodies, 13 Zentriolen. (b) Vergrößerung eines Mitochondriums.	12
3.2.1	Die mitochondriale Atmungskette in der inneren Mitochondrien-Membran. Sie besteht aus einer Elektronentransportkette (Komplexe I-IV) und der ATP-Synthase (Komplex V). Elektronen werden von NADH oder von FADH ₂ auf Sauerstoff übertragen, um Energie für die Bildung von ATP zu gewinnen.	15
3.3.1	Die bakterielle Cytochrom c Oxidase; (a) und (b) sind Seitenansichten in der Membranebene, (c) ist die Ansicht aus dem Cytoplasma auf das Enzym. In (a) ist das C-terminale Ende von Untereinheit II markiert, an welches der Histidin-Anker für eine Immobilisierung in der Down-Konfiguration angefügt wird. . . .	18
3.3.2	(a) CcO mit markiertem C-terminalen Ende von Untereinheit I, an welches der Histidin-Anker für eine Immobilisierung in der Up-Konfiguration angefügt wird; (b) Vergrößerung der vier Redoxzentren. Die CcO beinhaltet zwei Häm- und zwei Cu-Zentren.	19

3.4.1	Katalytischer Zyklus der Cytochrom c Oxidase. Dargestellt ist jeweils die Konfiguration des aktiven Zentrums (Häm-a ₃ -Cu _B -Zentrum). Für das Intermediat P _M sind alternative Strukturen aufgeführt, die in der aktuellen Forschung diskutiert werden [45].	21
3.4.2	Protonenwege in der Cytochrom c Oxidase, links: D-Weg, rechts: K-Weg. Im K-Weg werden die Protonen über die Aminosäuren Serin 291, Lysin 354, Threonin 351 und Tyrosin 280 zum aktiven Zentrum geleitet. Im D-Weg sind nach der Aminosäure Aspartat 124 etliche weitere Aminosäuren beteiligt. Schließlich gelangen die Protonen zum Glutamat 278, von wo sie entweder zum binuklearen Zentrum oder in Richtung des Protonenausgangsweges dirigiert werden.	23
3.4.3	Verschiedene Modelle für den katalytischen Zyklus der Cytochrom c Oxidase: (a) Wikström 1989, (b) Michel 1998, (c) Wikström 2000; rot: gepumpte Protonen, grün: Aufnahme von Substratprotonen. Nähere Erläuterungen s. Text; die Abbildung ist einer Graphik in [66] nachempfunden.	26
3.5.1	Technik der Protein-Immobilisierung mittels eines Histidin-Ankers: (a) Ankerregion, (b) Angebundenes Protein nach Rekonstitution in eine Membran.	29
3.5.2	Rekonstituierte Cytochrom c Oxidase mit Cytochrom-c-Bindungsstelle zur Elektrode hin orientiert (links, „Down-Konfiguration“), bzw. von der Elektrode weg orientiert (rechts, „Up-Konfiguration“). Die Ladungstransferwege sind eingezeichnet. In vorliegender Arbeit wird größtenteils die Down-Konfiguration behandelt, angeregt durch den eingezeichneten direkten Elektronentransfer. . . .	30
3.6.1	Das bakterielle photosynthetische Reaktionszentrum; (a) und (b) sind Seitenansichten in der Membranebene, (c) ist die Ansicht aus dem Periplasma auf das Enzym. Der Histidin-Anker wird an den C-Terminus von Untereinheit M angefügt.	32
3.6.2	Die prosthetischen Gruppen des Reaktionszentrums. BChl: Bakterioclorophyll (rot); BPh: Bakteriopheophytin (blau); Q: Chinon (orange). Der Zyklus ist im Text erläutert.	33

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

4.1.1	Zweiatomiges Molekül-Modell mit unterschiedlichen Massen. Die interatomare Kraft, die das Molekül zusammenhält, wird durch eine masselose Feder repräsentiert.	39
4.1.2	Quantisierte Energie-Eigenzustände des harmonischen Oszillators.	41
4.1.3	Unabhängige Schwingungsmoden eines dreiatomigen nicht-linearen Moleküls	43
4.1.4	Infrarot-Absorptionsspektrum von Hexan. Es wird deutlich, dass bei einem komplexeren Molekül als bei dem zweiatomigen Beispiel-Molekül, an dem die Rechnungen angestellt wurden, komplexe Spektren entstehen.	44
4.1.5	Verschiedene Linienprofile für Infrarotbanden. Das Voigt-Profil ist eine Faltung aus Gauß- und Lorentz-Profil.	45
4.1.6	Modell der Methylacetamid-Gruppe	48
4.2.1	Schematische Darstellung des Michelson-Interferometers. (a) Komponenten (b) Funktionsweise. Die Funktionsweise ist im Text erläutert	51
4.2.2	Interferogramm eines FTIR-Spektrometers	52
4.2.3	(a) Absolute Intensitätsspektren von Probe und Referenz; (b) daraus berechnete Absorption. Es handelt sich um ein typisches Protein-Spektrum mit deutlich ausgeprägten Peaks in der Amid-Region: (i) Amid-I-, (ii) Amid-II-Bande.	54
4.2.4	Schematische Darstellung der stufenförmigen Bewegung des beweglichen Spiegels. Nach Fortschreiten des Spiegels muss eine Stabilisierungszeit abgewartet werden. Danach wird das Experiment gestartet und die zeitaufgelösten Messpunkte für die entsprechende Interferogrammposition werden aufgezeichnet. [87] .	56
4.3.1	Vergleich der beiden Methoden der IR-Absorptionsmessung; (a) Transmission und (b) interne Reflexion. Q: Infrarot-Strahlungsquelle; P: Probe mit Brechungsindex n_2 ; SP: Spektrometer; IRE: Internes Reflexionselement mit Brechungsindex n_1 ; θ = Einfallswinkel; θ_c = kritischer Einfallswinkel. Die Abbildung ist einer Abbildung aus [88] nachempfunden.	57

4.3.2	Definiertes Koordinatensystem für die Komponenten der elektrischen Feldstärke. E_s ist die Komponente des einfallenden Feldes senkrecht zur Einfallsebene (s-polarisierter Anteil), E_p ist der Anteil parallel zur Einfallsebene (p-polarisierter Anteil).	59
4.3.3	Modell zur Simulation des Verstärkungseffekts durch Silber-Nanopartikel. Die Silberinseln werden als oblate Ellipsoide modelliert, ein effektiver Brechungsindex der gemischten Schicht aus Metallinseln und Dielektrikum wird für die Rechnung benutzt.	61
4.3.4	AFM-Aufnahme der rauen Goldschicht. Die Oberfläche besteht aus Gold-Nanopartikeln, die einen Durchmesser von 10 bis 50 nm haben. Die Schicht ist 20 nm dick.	63
4.4.1	Oben: Periodische Stimulation (grün) und daraus resultierende Änderungen in der Konzentration einer absorbierenden Spezies (rot); unten: Ausschnitt. Details sind im Text erläutert.	66
5.1.1	(a) Im einfachen Helmholtz-Modell einer elektrischen Doppelschicht lagert sich an einer negativ geladenen Elektrode eine Schicht aus positiven Ionen an; (b) ein differenzierteres Modell für die Doppelschicht-Region: Es bildet sich auf der Seite der Lösung eine kompakte Schicht aus spezifisch adsorbierten Ionen (im gezeigten Fall Anionen) und Lösungsmittel. Unspezifisch adsorbierte Ionen sind über die diffuse Schicht verteilt.	81
5.1.2	Impedanz in der komplexen Ebene. Z' ist der Realteil, Z'' ist der Imaginärteil von Z	84
5.1.3	Impedanzspektren für eine Schaltung mit einem Ohmschen Widerstand. Links unten: Nyquist-Plot, rechts oben: frequenzreduzierter Admittanzplot, rechts unten: Bode-Plot ($\Phi(\omega)$: Kreise, $ Z (\omega)$: Dreiecke). Als Beispiel für die Simulation wurde ein Widerstand mit $R=50 \text{ k}\Omega$ (rot) bzw. $R=100 \text{ k}\Omega$ (blau) gewählt. . .	88
5.1.4	Impedanzspektren für eine Schaltung mit einem Kondensator. Links unten: Nyquist-Plot, rechts oben: frequenzreduzierter Admittanzplot, rechts unten: Bode-Plot ($\Phi(\omega)$: Kreise, $ Z (\omega)$: Dreiecke). Als Beispiel für die Simulation wurde eine Kapazität mit $C=5 \text{ }\mu\text{F}$ (rot) bzw. $C=50 \text{ }\mu\text{F}$ (blau) gewählt.	90

5.1.5 Impedanzspektren für eine Reihenschaltung aus Ohmschem Widerstand und Kapazität. Links unten: Nyquist-Plot, rechts oben: frequenzreduzierter Admittanzplot, rechts unten: Bode-Plot ($\Phi(\omega)$): gefüllte schwarze Kreise, $|Z|(\omega)$: offene Vierecke). Als Beispiel für die Simulation wurde ein Ohmscher Widerstand mit $R=5\text{ M}\Omega$ und eine Kapazität mit $C=5\text{ }\mu\text{F}$ gewählt. 92

5.1.6 Impedanzspektren für eine Parallelschaltung aus Ohmschem Widerstand und Kapazität. Links unten: Nyquist-Plot, rechts oben: frequenzreduzierter Admittanzplot, rechts unten: Bode-Plot ($\Phi(\omega)$): offene Vierecke, $|Z|(\omega)$: gefüllte schwarze Kreise). Als Beispiel für die Simulation wurde ein Ohmscher Widerstand mit $R=5\text{ M}\Omega$ und eine Kapazität mit $C=5\text{ }\mu\text{F}$ gewählt. 95

5.1.7 Impedanzspektren für ein RC-Glied mit vorgeschaltetem Ohmschen Widerstand. Dieser Ersatzschaltkreis repräsentiert einen auf einer Elektrode assemblierten Monolayer. Oben: frequenzreduzierter Admittanzplot, Mitte: Bode-Plot ($\Phi(\omega)$: offene Vierecke, $|Z|(\omega)$: gefüllte schwarze Kreise), unten: Nyquist-Plot. Als Beispiel für die Simulation wurde als Ohmscher Lösungsmittel-Widerstand $R_1=50\text{ }\Omega$, für die Schicht $R_2=100\text{ k}\Omega$ und $C=8\text{ }\mu\text{F}$ gewählt. 97

5.1.8 Impedanzspektren für zwei RC-Glieder mit vorgeschaltetem Ohmschen Widerstand. Dieser Ersatzschaltkreis repräsentiert z.B. eine Protein-verankerte Lipid-Membran, wobei ein RC-Glied die Protein-Schicht mit Membran, das andere RC-Glied die Ankerregion repräsentiert. Oben: frequenzreduzierter Admittanzplot, Mitte: Bode-Plot ($\Phi(\omega)$: offene Vierecke, $|Z|(\omega)$: gefüllte schwarze Kreise), unten: Nyquist-Plot. Die Beispielwerte für die Simulation sind in der Tabelle angegeben. 99

5.2.1	(a) Das bei zyklischer Voltammetrie angelegte Potenzial hat eine Dreiecksform, da es in Abhängigkeit von der Zeit linear zwischen einem negativen und einem positiven Potenzial hin- und hergefahren wird. (b) Resultierendes Cyclovoltammogramm mit typischer Kurvenform für einen reversiblen Ladungstransfer (s.u.). E_A : anodisches Spitzenpotenzial, E_C : kathodisches Spitzenpotenzial, E_1 und E_2 : Umkehrpotenziale, E^0 : Redoxpotenzial	102
5.2.2	Cyclovoltammogramm einer Oberflächen-fixierten Redox-Spezies. Die Peaks sind Gauß-förmig und symmetrisch, die Halbwertsbreite beträgt 90,6mV dividiert durch n.	107
6.1.1	Verteilung des magnetischen Feldes eines Oberflächenplasmons senkrecht zur Grenzfläche	113
6.1.2	Evaneszenter Charakter eines Oberflächenplasmons, das an einer Metall/Dielektrikum-Grenzfläche (y-z-Grenzfläche) angeregt wurde und in z-Richtung propagiert. Die Komponente des elektrischen Feldes in x-Richtung, senkrecht zur Oberfläche, fällt exponentiell ab. Bild: [113]	117
6.1.3	(a) Beziehung zwischen dem Impuls eines Oberflächenplasmons \vec{k}_{sp} , welches in z-Richtung propagiert, und dem Impuls eines einfallenden Photons \vec{k}_{ph} , das unter dem Winkel θ auf die Grenzfläche Dielektrikum/Metall auftrifft. Für jeden Winkel θ gilt: $ \vec{k}_{ph} < \vec{k}_{sp} $; (b) Dispersionsrelation eines Photons im dielektrischen Medium (blau, durchgezogen) und im Prisma (blau, gestrichelt) sowie Dispersionsrelation des Oberflächenplasmons (rot); Details sind im Text erläutert [113].	119
6.1.4	Oberflächenplasmonen-Anregung in der Kretschmann-Konfiguration. Ein dünner Metallfilm ($d \approx 50$ nm) wird auf die Basisfläche des Prismas aufgedampft und wirkt als Resonator für das Feld des einfallenden Photons unter dem Einfallswinkel θ	120
6.1.5	Rechts: Änderung der Dispersionsrelation des Oberflächenplasmons durch Anlagern einer dielektrischen Schicht mit einem Brechungsindex, der sich vom Brechungsindex des benachbarten Dielektrikums unterscheidet. Links: resultierende Verschiebung des Anregungswinkels für ein Oberflächenplasmon.	121

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

6.1.6	Kinetik-Messung zur Schichtdickenbestimmung mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie. Die Verschiebung des Plasmons durch Adsorption einer dielektrischen Schicht zu höheren Winkeln (a) lässt sich verfolgen, indem man bei einem festen Winkel die Änderung der Reflektivität verfolgt (b). Dieser Winkel sollte möglichst in der Flanke des Plasmons liegen, um den Effekt zu maximieren.	123
6.1.7	Funktionsprinzip der Rasterkraftmikroskopie (AFM). Erläuterungen s. Text.	124
7.1.1	Präparation einer ultraflachen TSG-Oberfläche.	130
7.2.1	Die Poliermaschine Phoenix 4000 von Buehler.	132
7.3.1	Die Moleküle (a) DTP und (b) DTSP im Vergleich.	134
7.3.2	Die Dialyse. Links ist das angebundene Protein-Molekül Cytochrom c Oxidase zu sehen, das in seiner hydrophoben Region von Detergens-Molekülen geschützt wird. Rechts ist das Protein in eine Lipid-Membran rekonstituiert. Die Lipid-Mizelle (Mitte) ist ebenfalls von Detergens-Molekülen eingeschlossen, welche während der Dialyse von Biobeads absorbiert werden.	137
8.1.1	Der Messaufbau für die SPR-Experimente. Mit der Zelle sind gleichzeitig elektrochemische Experimente möglich; WE: working Elektrode (Arbeitselektrode); CE: counter Electrode (Gegenelektrode); RE: Referenzelektrode. Die einzelnen Elemente des Aufbaus sind im Text erläutert. Messzelle und Prisma sind im Verhältnis zum Messaufbau überproportional groß dargestellt. . . .	143
8.1.2	Photos der SPR-Messzelle mit Prisma; (a) Vorderansicht mit gekennzeichneten Elektroden; (b) Draufsicht. Der Messaufbau ist auf einem Goniometer montiert.	144
8.2.1	Der ATR-Kristall aus Silizium.	145

8.2.2	Der Einsatz für die Probenkammer des FTIR-Spektrometers mit Messzelle. WE: working Electrode (Arbeits Elektrode); CE: counter Electrode (Gegenelektrode); RE: Reference Electrode (Referenzelektrode). Der abgebildete hemisphärische ATR-Kristall wurde im Verlauf der Arbeit durch einen prismenförmigen Kristall (s. Abbildung 8.2.1) ersetzt.	147
8.2.3	Photos der Probenkammer mit Messzelle im FTIR-Spektrometer; (a) Vorderansicht der Probenkammer; (b) vergrößerte Ansicht der elektrisch kontaktierten Messzelle; rot: Arbeits Elektrode, schwarz: Gegenelektrode, blau: Referenzelektrode.	148
8.2.5	Kompletter Messaufbau für zeitaufgelöste ATR-FTIR-Experimente.	151
8.3.1	Das Rasterkraftmikroskop Dimension 3100 CL zur Vermessung trockener Oberflächen. Mit diesem Gerät sind Messungen an großen Proben möglich (bis zu 15cm), so dass Proben im Originalzustand vermessen werden können und es keiner speziellen Präparation z.B. auf AFM-Specimen bedarf.	153
8.3.2	Das Rasterkraftmikroskop Multimode Tuna/Torsion zur Vermessung von Oberflächen in wässriger Lösung. Proben werden auf AFM-Specimen mit einem Durchmesser von 1 cm präpariert. Es muss in einer speziellen Flüssigkeitszelle gemessen werden. . . .	154
9.1.1	Schematische Darstellung eines Laminin-Moleküls. Laminine bestehen aus drei Proteinketten, die sich in heterotrimerer Form zum jeweiligen Laminin-Molekül zusammensetzen.	160
9.1.2	AFM-Aufnahmen von aufgedampften Gold (a) und Gold, welches mit der in Abschnitt 7.2 beschriebenen chemischen Depositionsmethode auf den Si-Kristall aufgebracht wurde (b). Für (a) beträgt die RMS-Rauigkeit 0,90 nm, für (b) beträgt die RMS-Rauigkeit 5,83 nm. Die Schichtdicke beträgt in beiden Fällen 20 nm. In der 3D-Ansicht ist deutlich die Nanopartikel-Struktur der rauen Goldoberfläche (b) zu erkennen.	162

9.1.3	IR-Absorptionsspektrum eines Laminin-Monolayers nach 30 Minuten Anbindungszeit auf rauem Gold (grün) und auf glattem Gold (blau). Man erkennt in beiden Spektren Amid-Peaks bei 1649 cm^{-1} (Amid I) und bei 1522 cm^{-1} (Amid II). Der Verstärkungsfaktor durch die rauere Goldschicht beträgt etwa sechs. . .	163
9.2.1	Aufbau des DPTL-Moleküls	164
9.2.2	DPTL-SAM: Illustration der helikalen Struktur der OEG-Gruppe nach Adsorption auf einer Goldoberfläche.	165
9.2.3	Widerstand und Kapazität des DPTL-Monolayers nach Eintauchen in KCL-Lösung in Abhängigkeit von der Zeit. Der Sprung in beiden Kurven bei knapp 6 Stunden wird durch eine in die Messzelle eindringende Luftblase verursacht.	166
9.2.4	Absorptionsspektrum eines DPTL-SAMs nach der Assemblierungszeit von 24 Stunden. Die identifizierten Banden sind im Text erläutert.	167
9.2.5	(a) Zeitliche Entwicklung des OH-peaks, nachdem der DPTL-SAM in KCL-Lösung getaucht wurde; (b) Aufintegrierte Fläche des OH-peaks in Abhängigkeit von der Zeit und monoexponentieller Fit. Die errechnete Zeitkonstante beträgt $\tau = 16,51 \pm 1,66h$.	169
9.3.1	Oben: In-vitro-Synthese eines Membranproteins (z.B. GPCR) in direktem Kontakt mit einer planaren Lipidmembran. Unten: Darstellung eines in-vitro synthetisierten OR5-Rezeptors, der in eine planare Lipidmembran integriert wurde.	172
9.3.2	Struktur des Lillial-Moleküls	174
9.3.3	(a) IR-Spektrum eines Membransystems, das mit einem in-vitro-Expressionsansatz inkubiert wurde, der die cDNA für N-terminal VSV-markiertes OR5-Protein enthält. (b) Referenzexperiment: Membransystem, das mit einem in-vitro-Expressionsansatz inkubiert wurde, der keine cDNA enthält. . .	175
9.4.1	Die Moleküle DTP (a) und DTSP (b) im Vergleich.	177
9.4.2	Mit XPS gemessene Elementverhältnisse Sauerstoff zu Schwefel und Stickstoff zu Schwefel auf der Goldoberfläche im Vergleich zu den Verhältnissen in Lösung.	179

9.4.3	Konzentrationsprofil einer Spezies, die auf der Oberfläche adsorbiert wird.	180
9.4.4	Peakhöhe der Amid-I-Bande als Funktion der Zeit während des Kopplungsprozesses von ANTA an den gemischten TSP/TP-Monolayer mit angefitteten monoexponentiellen Funktionen; orange: unverdünnte TSP-Schicht, blau: 60%-DTSP-Schicht	183
9.4.5	Basislinienkorrigierte und auf die Scan-Rate normalisierte kathodische Peaks von zyklischen Voltammogrammen des direkten Elektronentransfers in die CcO bei verschiedenen Mischungsverhältnissen DTSP:(DTSP+DTP).	184
9.4.6	(a) Beispiel eines Cyclovoltammogramms für eine Schicht aktiver CcO-Moleküle; (b) Oberflächenbelegungsdichte der aktiven CcO-Moleküle, berechnet aus den aufintegrierten Peakflächen aus Abbildung 9.4.5, in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis.	185
9.4.7	(a) Kapazitäten und (b) Widerstände der CcO-Schicht vor der Dialyse (grau) und der CcO-Schicht mit Membran nach der Dialyse (schwarz) als Funktion des Mischungsverhältnisses DTSP zu DTP. Die Kapazität nimmt durch die Dialyse stets ab. Das Optimum liegt bei einem Verhältnis von 60%, hier werden auch sehr gute Absolutwerte erreicht. Der Widerstand nimmt durch die Dialyse stets zu, auch hier liegt das Optimum bei 60%.	187
9.4.8	AFM-Aufnahmen (Tapping Mode) von TSG-Gold (a) und von CcO, die an die gemischte NTA-Schicht gebunden ist. Die Mischungsanteile DTSP/(DTSP+DTP) sind (b) 0,001, (c) 0,1, (d) 0,6 and (e) 1,0.	191
9.5.1	Kinetikmessung der CcO-Anbindung und der Membran-Rekonstitution (blaue Kurve) und winkelabhängige Absorptionskurven (kleines Bild). Die verschiedenen Schritte des Experimentes sind im Text erläutert.	194

9.5.2	(a) FTIR-Spektren der Kopplung von ANTA mit dem TSP-Monolayer. Die negativen Banden können Schwingungen im Succinimidyl-Ring zugeordnet werden, der während der Reaktion in Lösung geht. Die positiven Banden können unterschiedlichen Schwingungen im ANTA-Molekül zugeordnet werden (s. Text); (b) 3-dimensionale Veranschaulichung.	197
9.5.3	Änderung der Schwingungsanregung des NTA durch die Komplexierung von Ni^{2+} . Das Referenzspektrum wurde vor der Zugabe von 50mM $NiSO_4$ aufgenommen. Gezeigt ist ein Spektrum 15 Minuten nach der Zugabe, hier ist die Komplexierung bereits abgeschlossen.	198
9.5.4	(a) FTIR-Spektren der Anbindung von CcO an die TP-NTA-Ni-Gruppe. Abgebildet ist der Amid-Bereich. Neben den drei Amidbanden (Amid I, II und III) sind Banden zu sehen, die durch die Komplexbildung hervorgerufene Konformationsänderungen in der NTA-Gruppe zeigen; (b) 3D-Ansicht.	201
9.5.5	FTIR-Spektren der Anbindung von CcO an die TP-NTA-Ni-Gruppe: (a) OH-Bereich; (b) Methyl-Bereich (Ausschnitt aus (a))	202
9.5.6	Adsorptionskinetik der CcO auf der NTA-Ni-Oberfläche. Die Fläche der Amid-II-Bande aus Abbildung 9.5.4 wird in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Zur Bestimmung der Zeitkonstanten wird eine Exponentialfunktion angefitet. Nach etwa 40 Minuten findet unspezifische Anbindung statt. Dies ist bei dem Fit zu berücksichtigen. Die ermittelte Zeitkonstante für die Anbindung beträgt $\tau = 571$ s bzw. 9 min 31 s.	204
9.5.7	FTIR-Differenzspektrum nach Abschluss der Dialyse. Die auftretenden Methylbanden zeigen die Anlagerung des Lipids DPhyPC.	207
9.5.8	Elektrische Impedanzspektren der reinen TP-NTA-Ni-Schicht (A), der Schicht nach CcO-Anbindung (D) und der fertigen Schicht nach Membran-Rekonstitution (E). (a) Bode-Plot; (b) Frequenzreduzierter Admittanzplot. Gepunktet sind die angefiteten Kurven eingezeichnet. Die Beschriftung der Präparationsschritte mit A, D und E soll -Abbildung 9.5.1 folgend- einer guten Übersicht dienen.	209

9.5.9	Äquivalenzschaltbilder für die Fits der Messkurven in Abbildung 9.5.8; (a) Schaltbild für die Fits vor der Protein-Anbindung; (b) Schaltbild für die Fits nach der Protein-Anbindung und nach der Rekonstitution. Details s. Abschnitt 5.1.5	210
9.6.1	(a) Impedanz-Spektren (Bode-Plot-Darstellung) der in die pt-BLM eingebetteten CcO als Funktion der Cyt-c-Konzentration bei einer angelegten Vorspannung von +200mV; (b) Zuordnung Farbe → Cyt-c-Konzentration	213
9.6.2	Widerstand des Systems, der sich durch Anfitten der Impedanzkurven aus Abbildung 9.6.1 unter Benutzung des Äquivalent-schaltkreises aus Abbildung 9.5.9 ergibt, als Funktion der Cyt c-Konzentration. Es ergibt sich näherungsweise ein exponentieller Zusammenhang der Form $R(c) = a \cdot e^{-b \cdot c}$, mit $a=2,44 \pm 0,08 M\Omega$ und $b=2007,6 \pm 47,9 \text{ L/mol}$	214
9.7.1	Kinetikmessung der Anbindung des Reaktionszentrums und der Membran-Rekonstitution.	218
9.7.2	Durch Simulation der SPR-Kurven erhaltene Schichtdicken. Die Werte für die CcO sind zum Vergleich mit in die Tabelle aufgenommen.	219
9.7.3	Die beiden auf einer Goldschicht verankerten Membranproteine Cytochrom c Oxidase (rechts) und das bakterielle photosynthetische Reaktionszentrum (links) im Größenvergleich.	219
9.7.4	FTIR-Spektren der Anbindung von bakteriellem Reaktionszentrum an die TP-NTA-Ni-Gruppe. Abgebildet ist der Amid-I/Amid-II-Bereich.	220
9.7.5	Zyklische Voltammogramme am immobilisierten Reaktionszentrum mit einer Scan-Rate von 100mV/s. Grün: Probe abgedunkelt, orange: Probe beleuchtet.	220
10.1.1	Änderungen des Redoxzustandes der Zentren Cu_A , Häm a und Häm a_3 . Zuordnung der Banden: Cu_A : 1651, 1600, 1431 cm^{-1} ; Häm a: 1546, 1537 cm^{-1} ; Häm a_3 : 1655, 1641, 1633, 1561, 1473 cm^{-1} . Eine genaue Zuordnung zu den umgebenden Gruppen bzw. Sekundärstrukturen ist im Text bzw. in den Tabellen D.3.1, 10.1.1, 10.1.2 und 10.1.3 gegeben.	225

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- 10.2.1 (a) Phasenaufgelöste FTIR-Spektren einer Messung mit einer Anregungsfrequenz von 0,8 Hz. Die Winkelauflösung beträgt $\Delta\varphi=15^\circ$. (b) Angefittete Banden. 229
- 10.2.2 (a) Zeitaufgelöste FTIR-Spektren mit einer Zeitauflösung von $\Delta t = 78ms$. Teilweise wurden zur Verbesserung des SNR zwei Spektren auf Kosten der Zeitauflösung gemittelt. (b) Angefittete Kurven mit den aus Abbildung 10.2.1 (b) übernommenen Fitparametern. Die Originalkurven sind grau unterlegt dargestellt. . . 230
- 10.2.3 Peakfläche der Bande bei 1635 cm^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit bei einer Anregungsfrequenz von 0,8 Hz. Zunächst ist der reduktive Ast dargestellt, dann folgt die Oxidation bei Umschalten des Potentials von -700mV auf +300mV. Anfitten dreiparametrischer monoexponentieller Funktionen nach Gleichung 10.2.2 liefert für den reduktiven Ast eine Zeitkonstante von $\tau = 176,1 \pm 29,8ms$, dies entspricht $k_s=5,7 \pm 0,1$ Übergängen pro Sekunde. Für die Oxidation ergibt sich eine Zeitkonstante von $\tau = 72,5 \pm 12,2ms$, dies entspricht $k_s = 13,8 \pm 2,3$ Übergängen pro Sekunde. 232
- 10.3.1 Phasenaufgelöste FTIR-Spektren mit einer Winkelauflösung von $\Delta\varphi=15^\circ$. Die Anregungsfrequenz beträgt 0,13Hz. 234
- 10.3.2 (a) Zeitaufgelöste FTIR-Spektren mit einer Zeitauflösung von $\Delta t=962\text{ ms}$. Die Anregungsfrequenz beträgt 0,13 Hz. Man erkennt deutlich die Separation der Kurven in zwei Gruppen, den oxidierten und den reduzierten Zustand. (b) Die Peakfläche des Cu_A -Peaks bei 1649 cm^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Es wird deutlich, dass sich keine Exponentialfunktionen anfitten lassen, dass sich aber sehr wohl der oxidierte und der reduzierte Zustand des Redoxzentrums gut unterscheiden lassen. 235
- 10.3.3 Phasenaufgelöste FTIR-Spektren mit einer Winkelauflösung von $\Delta\varphi=15^\circ$. Die Anregungsfrequenz ist 100Hz. 236
- 10.3.4 Zeitaufgelöste FTIR-Spektren mit einer Zeitauflösung von $\Delta t=1000\text{ }\mu s$. Die Anregungsfrequenz ist 100 Hz. 238

10.3.5 Peakfläche des Cu_A -Peaks bei 1650 cm^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit. Aufgrund der verrauschten Daten kann nur der oxidative Ast mit einer monoexponentiellen Funktion angefitet werden: es ergibt sich eine Zeitkonstante von $\tau=854,7\pm 467,5 \mu\text{s}$, das entspricht 1170 ± 640 Übergängen in einer Sekunde. 238

10.3.6 Phasenaufgelöste FTIR-Spektren mit einer Winkelauflösung von $\Delta\varphi = 15^\circ$. Die Lage der im Fit verwendeten Banden ist eingezeichnet, die deutlichsten Banden sind mit Lage des Zentrums eingetragen. 239

10.3.7 (a) Zeitaufgelöste FTIR-Spektren mit einer Zeitauflösung von $\Delta t=100\mu\text{s}$. (b) Peakfläche der Cu_A -Bande bei 1648 cm^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit. Deutlich ist die Asymmetrie zwischen Reduktion und Oxidation zu erkennen. Die Oxidation setzt nicht nach der halben Periode ein, sondern erst bei etwa 600 bis 650 μs , wodurch auch die Phasenverschiebung von $-72,3^\circ$ zustande kommt. 241

10.4.1 (a) Vergleichsexperiment: (a) Phasenaufgelöste ATR-FTIR-Spektren von CcO mit der Cc- Bindungsstelle zur Elektrode hin orientiert, die Anregungsfrequenz ist 1kHz. Die Winkelauflösung beträgt $\Delta\varphi=15^\circ$; (b) das gleiche Experiment, aber mit CcO mit der Cc-Bindungsstelle von der Elektrode weg orientiert. 243

10.5.1 Phasenaufgelöste IR-Spektren mit einer Winkelauflösung von $\Delta\varphi=15^\circ$. Die Cu_A -Bande bei 1407 cm^{-1} wird im Folgenden analysiert. . . 244

10.5.2 (a) Zeitaufgelöste FTIR-Spektren mit einer Zeitauflösung von $\Delta t=20\mu\text{s}$. Die Anregungsfrequenz beträgt 5 kHz. (b) Peakhöhe der Cu_A -Bande in Abhängigkeit von der Zeit. Trotz des schlechten SNR können dreiparametrische Exponentialfunktionen angefitet werden. 245

A.1.1 Eingabefenster der Software Wasplas. Es können verschiedene Winkelbereiche mit definierten Winkelauflösungen vorgegeben werden. 260

A.1.2	Arbeitsoberfläche des Programms Winspall. Die durch Datenpunkte dargestellten Kurven sind gemessene Plasmonen. Die durchgezogene Kurve ist das Ergebnis der manuellen Simulation, deren Parameter in der Abbildung zu sehen sind und deren Bedeutung in Abbildung A.1.3 erklärt ist.	261
A.1.3	Parameter der Winspall-Simulation. Die fünf Zeilen zeigen die Parameter Optische Dicke d sowie Real- und Imaginärteil ϵ' und ϵ'' der fünf aufeinander folgenden Schichten.	262
A.2.1	Elektrische Impedanzmessung mit der Software FRA und Fit der Daten mit einem Ersatzschaltbild bestehend aus einem Ohmschen Widerstand, der die Lösung repräsentiert, einem RC-Glied für den Submembranraum (R3C1) und einem RQ-Glied, welches die Protein-Membran-Schicht repräsentiert (Ohmscher Widerstand mit parallelem CPE).	264
A.3.1	Fitroutine der OPUS-Software. Es können beliebig viele Banden gleichzeitig angefitet werden. Die möglichen Bandenformen sind Gauß-förmige Banden, Lorentz- oder Voigt-Kurven.	267
A.3.2	Eingabefenster für das PSD-Makro. In dieser Arbeit wird nur mit der Grundfrequenz gearbeitet (die Anzahl der harmonischen Obertöne ist ein Eingabeparameter).	269
C.1.1	Konstruktionszeichnungen des Probenkammereinsatzes für das FTIR-Spektrometer IFS 66 bzw VERTEX 70 (beide Bruker); (a) Bodenplatte mit Kugelkopfschrauben zur Höhenverstellung und Justage; (b) Aufsatz zum Festschrauben der Messzelle. . . .	278
C.1.2	Konstruktionszeichnungen des Probenkammereinsatzes für das FTIR-Spektrometer IFS 66 bzw. VERTEX 70 (beide Bruker); (a) 3D-Ansicht mit eingelegtem ATR-Kristall; (b) Vorderansicht mit aufgeschraubter Zelle und Strahlengang.	279
C.1.3	Halterung für die Messzelle.	281
C.1.4	Die Messzelle mit einem Volumen von 1,2 ml.	282
C.1.5	Der Block mit Goldfuß zur Kontaktierung der Goldoberfläche. . .	283
C.1.6	(D) Der Deckel der Messzelle, (E) Die Wanne für die Goldbeschichtung.	284

Tabellenverzeichnis

4.1.1	Bereiche des elektromagnetischen Spektrums und Zahlenwerte für verschiedene Einheiten im Vergleich. Der Standard-Nomenklatur folgend wird in dieser Arbeit die Einheit Wellenzahl ($\tilde{\nu}$) benutzt. Die in dieser Arbeit auftretenden Wellenzahlen bewegen sich im Bereich der mittleren Infrarotstrahlung, dieser Bereich ist rot markiert.	38
4.1.2	Berechnete Amid-Banden nach [20] und [21] mit prozentualer Beteiligung der Amid-Schwingungsmoden. s: Streckschwingung; d: Deformationsschwingung; T: Torsionsschwingung; ib: in-plane bend (Biegeschwingung in der Ebene); ob: out-of-plane bend (Biegeschwingung aus der Ebene heraus); CC _s : Methyl-C-Streckschwingung	47
4.1.3	Die 8 verschiedenen Schwingungsmoden der CONH-(N-Methylacetamid-) Gruppe	48
4.1.4	Zuordnung von Wellenzahlen der Amid I-, II- und III-Bande zu Sekundärstrukturen von Proteinen nach [72] [82].	49
7.2.1	Poliervorschrift für den Si-ATR-Kristall.	131
9.4.1	Vergleich der Parameter der Geradenfits aus Abbildung 9.4.2 mit den theoretischen Werten.	178
9.5.1	Durch Simulation der gemessenen SPR-Kurven erhaltene Schichtdicken für die Ankerregion, die CcO-Schicht und die CcO-Membran-Schicht.	195
9.5.2	Zuordnung von Wellenzahlen der Amid I-, II- und III-Bande zu Sekundärstrukturen von Proteinen (Auszug aus Tabelle 4.1.4) und Vergleich mit den für die CcO gemessenen Werten.	200

TABELLENVERZEICHNIS

9.5.3	Mit elektrischer Impedanzspektroskopie gemessene Werte für Widerstand und Kapazität der Schichten des ptBLM-Systems. . . .	211
10.1.1	Auszug aus Tabelle D.3.1: Cu _A -Peaks in den potentiostatischen Spektren	226
10.1.2	Auszug aus Tabelle D.3.1: Häm a-Peaks in den potentiostatischen Spektren	226
10.1.3	Auszug aus Tabelle D.3.1: Häm a ₃ -Peaks in den potentiostatischen Spektren	226
10.2.1	Phasenverschiebungen φ für die drei ausgeprägtesten Banden in Abbildung 10.2.2.	228
10.3.1	Phasenverschiebungen φ für drei charakteristische Banden in Abbildung 10.3.1.	234
10.3.2	Phasenverschiebungen φ für vier charakteristische Banden in Abbildung 10.3.1.	237
10.3.3	Phasenverschiebung φ für die Cu _A -Bande bei 1648 cm ⁻¹ in Abbildung 10.3.6. Die Phasenverschiebung bewegt sich weit im negativen Bereich, was darauf schließen lässt, dass der betreffende Prozess auf primäre Prozesse folgt. In diesem Fall ist dies das „wiring“ des Elektrons über die Ankergruppe bis zum Cu _A -Zentrum.	240
D.1.1	Die 20 kanonischen Aminosäuren mit zugehöriger Drei-Buchstaben-Abkürzung und Ein-Buchstaben-Code.	286
D.2.1	Absorptionsbanden der Methylgruppen, nach [134] (Auswahl). .	287
D.3.1	Zuordnung von IR-Banden zur Oxidoreduktion der einzelnen Redoxzentren der CcO und vorläufige Zuordnung zu bestimmten Infrarot-Schwingungen [23]. Für die Zuordnung wurden Daten aus verschiedenen Quellen benutzt, diese sind jeweils angegeben.	288

Literaturverzeichnis

- [1] P. Rich. Chemiosmotic coupling: The cost of living. *Nature*, 421:583, 2003.
- [2] J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber, and H. Michel. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of rhodospirillum rubrum at 3 Å resolution. *Nature*, 318:618–624, 1985.
- [3] E. Neher and B. Sackmann. Die Erforschung von Zellsignalen mit der Patch-Clamp-Technik. *Spektrum der Wissenschaft*, 5:42, 1992.
- [4] M. I. Verkhovskiy, A. Jasaitis, M. L. Verkhovskaya, J. E. Morgan, and M. Wikström. Proton translocation by cytochrome c oxidase. *Nature*, 6743:480–483, 1999.
- [5] H. M. Lee, T. K. Das, D. L. Rousseau, D. Mills, S. Ferguson Miller, and R. B. Gennis. Mutations in the putative h-channel in the cytochrome c oxidase from rhodospirillum rubrum show that this channel is not important for proton conduction but reveal modulation of the properties of heme a. *Biochemistry*, 39:2989–2996, 2000.
- [6] R. Coronado. Recent advances in planar phospholipid bilayer techniques for monitoring ion channels. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 15:259–277, 1986.
- [7] E. Sackmann. Supported membranes: Scientific and practical applications. *Science*, 271:5245, 1996.
- [8] R. Guidelli, G. Alloisi, L. Becucci, A. Dolfi, M. R. Moncelli, and F. T. Buoninsegni. New directions and challenges in electrochemistry. Bioelectrochemistry at metal/water interfaces. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 504:1–28, 2001.

- [9] W. Knoll, C. W. Frank, C. Heibel, R. Naumann, A. Offenhäuser, J. Ruhe, E. K. Schmidt, W. W. Shen, and A. Sinner. Functional tethered lipid bilayers. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 74:137–158, 2000.
- [10] R. Naumann, S.M. Schiller, F. Giess, B. Grohe, K.B. Hartman, I. Kärcher, I. Koeper, J. Lubben, K. Vasilev, and W. Knoll. Tethered lipid bilayers on ultraflat gold surfaces. *Langmuir*, 19(13):5435–5443, June 2003.
- [11] R. Naumann, E. K. Schmidt, A. Jonczyk, K. Fendler, B. Kadenbach, A. Offenhäuser, and W. Knoll. The peptide-tethered lipid membrane as a biomimetic system to incorporate cytochrome c oxidase in a functionally active form. *Biosensors and Bioelectronics*, 14 Issue 7:651–662, 1999.
- [12] G. Krishna, J. Schulte, B.A. Cornell, R.J. Pace, and P.D. Osman. Tethered bilayer membranes containing ionic reservoirs: Selectivity and conductance. *Langmuir*, 19(6):2294–2305, 2003.
- [13] F. Giess, M. Friedrich, J. Heberle, R. Naumann, and W. Knoll. The protein-tethered lipid bilayer: A novel mimic of the biological membrane. *Biophysical Journal*, 87:3213–3220, 2004.
- [14] K. Ataka, F. Giess, W. Knoll, R. Naumann, S. Haber-Pohlmeier, B. Richter, and J. Heberle. 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*, 126:16199–16206, 2004.
- [15] M. G. Friedrich, J. Robertson, D. Walz, W. Knoll, and R. Naumann. Electronic wiring of membrane proteins- a kinetic study of cytochrome c oxidase.
- [16] M. Plum. Orientierungsspezifische Studie der Cytochrom c Oxidase in einen biomimetischen Architektur auf Metalloberflächen. Master's thesis, 2007.
- [17] M. Friedrich. PhD thesis, 2007.
- [18] M. G. Friedrich, V. U. Kirste, J. Zhu, R. B Gennis, W. Knoll, and L. C. Naumann. Activity of membrane proteins immobilized in a biomimetic architecture as a function of packing density. 2007.

- [19] V. U. Kirste, M. G. Friedrich, J. Zhu, R. B. Gennis, W. Knoll, and R. L. C. Naumann. Time-resolved surface enhanced infrared reflection absorption spectroscopy into electrochemically induced electron transfer to cytochrome c oxidase. 2007.
- [20] S. Krimm and J. Bandekar. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein Chem.*, 38:181–364, 1986.
- [21] H. Susi. *Structure and Stability of Biological Macromolecules*, pages 575–663. Dekker, New York, 1969.
- [22] A. Barth. The infrared absorption of amino acid side chains. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 74:141–173, 2000.
- [23] E. A. Gorbikova, K. Vuorilehto, M. Wikström, and M. I. Verkhovsky. Redox titration of all electron carriers of cytochrome c oxidase by fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 45:5641–5659, 2006.
- [24] P. M. Callahan and G. T. Babcock. Origin of the cytochrome a absorption red shift: a pH-dependent interaction between its heme a formyl and protein in cytochrome oxidase. *Biochemistry*, 22(2):452–461, 1983.
- [25] J. Behr, P. Hellwig, W. Mantele, and H. Michel. Redox dependent changes at the heme propionates in cytochrome c oxidase from paracoccus denitrificans: Direct evidence from FTIR difference spectroscopy in combination with heme propionate ^{13}C labeling. *Biochemistry*, 37(20):7400–7406, 1998.
- [26] P. Hellwig, S. Grzybek, J. Behr, B. Ludwig, H. Michel, and W. Mäntele. Electrochemical and ultraviolet/visible/infrared spectroscopic analysis of heme a and a₃ redox reactions in the cytochrome c oxidase from paracoccus denitrificans: Separation of heme a and a₃ contributions and assignment of vibrational modes. *Biochemistry*, 38(6):1685–1694, 1999.
- [27] P.R. Rich and J. Breton. Attenuated total reflection fourier transform infrared studies of redox changes in bovine cytochrome c oxidase: Resolution of the redox fourier transform infrared difference spectrum of heme a₃. *Biochemistry*, 41(3):967–973, 2002.

- [28] P. R. Rich and M. Iwaki. Infrared protein spectroscopy as a tool to study protonation reactions within proteins. *RSC Publishing, Cambridge, U.K.*, pages 314–333, 2005.
- [29] J. M. Headrick, E. G. Diken, R. S. Walters, N. I. Hammer, R. A. Christie, J. Cui, E. M. Myshakin, M. A. Duncan, M. A. Johnson, and K. D. Jordan. Spectral signatures of hydrated proton vibrations in water clusters. *Science*, 308:1765–1769, 2005.
- [30] J. R. Winkler, B. G. Malmström, and H. B. Gray. Rapid electron injection into multisite metalloproteins: intramolecular electron transfer in cytochrome oxidase. *Biophysical Chemistry*, 54:199–209, 1995.
- [31] Ch. Leger, S. J. Elliot, K. R. Hoke, L. J. C. Jeuken, A. K. Jones, and F. A. Armstrong. Enzyme electrokinetics: Using protein film voltammetry to investigate redox enzymes and their mechanisms. *Biochemistry*, 42:8653–8662, 2003.
- [32] <http://www.lipofit.de/deutsch/biologie/abbildung2.html>, 2007.
- [33] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2003.
- [34] S. Roy. Caplan, I. R. Miller, and Giulio. Milazzo. *Bioelectrochemistry: general introduction*. Birkhauser, Basel; Boston, 1994.
- [35] D. M. Mitchell and R. B. Gennis. Rapid purification of wildtype and mutant cytochrome c oxidase from rhodobacter sphaeroides by Ni²⁺-NTA affinity chromatography. *FEBS Letters*, 368 (1):148–150, 1995.
- [36] M. Svensson-Ek, J. Abramson, G. Larsson, S. Tornroth, P. Brzezinski, and S. Iwata. The X-ray crystal structures of wild-type and EQ(I-286) mutant cytochrome c oxidases from rhodobacter sphaeroides. *Journal of Molecular Biology*, 321 Nr.2:329–339, 2002.
- [37] Pdb-protein-databank www.pdb.com.
- [38] S. Ferguson-Miller and G. T. Babcock. Heme/copper terminal oxidases. *Chemical Reviews*, 96:2889–2907, 1996.

- [39] T. Kitagawa and T. Ogura. Oxygen activation mechanism at the binuclear site of heme-copper oxidase superfamily as revealed by time-resolved resonance Raman spectroscopy. *Progr. Inorg. Chem.*, 45:431–479, 1997.
- [40] H. Michel, J. Behr, A. Harrenga, and A. Kannt. Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 27:329–356, 1998.
- [41] A. J. Moody, U. Brandt, and P. Rich. Single electron reduction of 'slow' and 'fast' cytochrome c oxidase. *FEBS letters*, 293:101–105, 1991.
- [42] W. H. Woodruff, O. Einarsdottir, R. B. Dyer, K. A. Bagley, G. Palmer, S. J. Atherton, R. A. Goldbeck, T. D. Dawes, and D. S. Kliger. Nature and functional implications of the cytochrome a_3 transients after photodissociation of co-cytochrome oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88:2588–2592, 1991.
- [43] B. Chance, C. Saronio, and J. S. Leigh. Functional intermediates in the reaction of membrane-bound cytochrome oxidase with oxygen. *Journal of Biological Chemistry*, 250:9226–9237, 1975.
- [44] H. Michel. The mechanism of proton pumping by cytochrome c oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95:12819–12824, 1998.
- [45] K. Budiman. *Spektroskopische Charakterisierung von P_M -, $F\bullet$ - und F -Intermediaten der Cytochrom c Oxidase von *Paracoccus denitrificans**. PhD thesis, Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main, 2006.
- [46] M. K. Wikström. Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria. *Nature*, 266:271–273, 1977.
- [47] M. K. Wikström and H. T. Saari. The mechanism of energy conservation and transduction by mitochondrial cytochrome c oxidase. *Biochimica and Biophysica Acta*, 462:347–361, 1977.

- [48] H. Witt, F. Malatesta, F. Nicoletti, M. Brunori, and B. Ludwig. Cytochrome c-binding site on cytochrome c oxidase in *paracoccus denitrificans*. *European Journal of Biochemistry*, 251:367–373, 1998.
- [49] R. Rieder and H. R. Bosshard. Comparison of the binding site on cytochrome c for cytochrome c oxidase, cytochrome bc₁ and cytochrome c₁. Differential acetylation of lysyl residues in free and complexed cytochrome c. *Journal of Biological Chemistry*, 255:4732–4739, 1980.
- [50] T. M. Antalis and G. Palmer. Kinetic characterization of interaction between cytochrome oxidase and cytochrome c. *Journal of Biological Chemistry*, 257:6194–6206, 1982.
- [51] B. C. Hill. The sequence of electron carriers in the reaction of cytochrome c oxidase with oxygen. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 25:115–120, 1993.
- [52] S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig, and H. Michel. Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *paracoccus denitrificans*. *Nature*, 376:660–669, 1995.
- [53] J. G. Lindsay, C. S. Owen, and D. F. Wilson. The invisible copper of cytochrome c oxidase. PH and ATP dependence of its midpoint potential and its role in the oxygen reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 169:492–505, 1975.
- [54] F. Malatesta, P. Sarti, G. Antonini, B. Vallone, and M. Brunori. Electron transfer to the binuclear center in cytochrom oxidase: catalytic significance and evidence for an additional intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87:7410–7413, 1990.
- [55] D. M. Mitchell, J. R. Fetter, D. A. Mills, P. Adelroth, M. A. Pressler, Y. Kim, R. Aasa, P. Brzezinski, B. G. Malmstrom, J. O. Alben, G. T. Babcock, S. Ferguson-Miller, and R. B. Gennis. Site-directed mutagenesis of residues lining a putative proton transfer pathway in cytochrome c oxidase from *rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 35:13089–13093, 1996.

- [56] R. B. Gennis. Site-directed mutagenesis studies on subunit I of the aa₃-type cytochrome c oxidase of rhodobacter sphaeroides: a brief review of progress to date. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1101:184–187, 1992.
- [57] T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, and S. Yoshikawa. The whole structure of the 13- subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 269:1069–1074, 1995.
- [58] A. A. Konstantinov, S. Siletzky, D. Mitchell, A. Kaulen, and R. B. Gennis. The roles of the two proton input channels in cytochrome c oxidase from rhodobacter sphaeroides probed by the effects of site-directed mutations on time-resolved electrogenic intraprotein proton transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94:9085–9090, 1997.
- [59] R. Pomès, G. Hummer, and M. Wikström. Structure and dynamics of a proton shuttle in cytochrome c oxidase. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1365:255–260, 1998.
- [60] I. Hofacker and K. Schulten. Oxygen and proton pathways in cytochrome c oxidase. *Proteins*, 30:100–107, 1998.
- [61] C. Ostermeier, A. Harrenga, U. Ermler, and H. Michel. Structure at 2.7 Å resolution of the paracoccus denitrificans two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody fv fragment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94:10547–10553, 1997.
- [62] U. Pfitzner, A. Odenwald, T. Ostermann, L. Weingard, B. Ludwig, and O.-M. H. Richter. Cytochrome c oxidase (heme aa₃) from paracoccus denitrificans: Analysis of mutations in putative proton channels of subunit I. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 30:89–97, 1998.
- [63] M. Wikström. Identification of the electron transfers in cytochrome oxidase that are coupled to proton pumping. *Nature*, 338:776–778, 1989.
- [64] M. Ruitenber, A. Kannt, E. Bamberg, B. Ludwig, H. Michel, and K. Fendler. Single-electron reduction of the oxidized state is coupled to proton uptake via the k pathway in paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97:4632–4636, 2000.
- [65] M. Wikström. Mechanism of proton translocation by cytochrome c oxidase: a new four-stroke histidine cycle. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1458:188–198, 2000.
- [66] M. Ruitenbergh. *Elektronen- und Protonentransport der Cytochrom c Oxidase von Paracoccus denitrificans*. PhD thesis, Universität Frankfurt am Main, 2001.
- [67] E. Hochuli, H. Döbeli, and A. Schacher. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of Chromatography*, 411:177–184, 1987.
- [68] E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Döbeli, R. Gentz, and D. Stuber. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Nat Biotech*, 6(11):1321–1325, November 1988.
- [69] J. O. Goldsmith and S. G. Boxer. Rapid isolation of bacterial photosynthetic reaction centers with an engineered poly-histidine tag. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1276:171–175, 1996.
- [70] J. Koepke, E. M. Krammer, A. R. Klinge, P. Sebban, G. M. Ullmann, and G. Fritzsche. pH modulates the quinone position in the photosynthetic reaction center from rhodospirillum rubrum in the neutral and charge separated states. 2007.
- [71] N. B. Colthup, L. H. Daly, and S. E. Wiberly. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. Academic Press, 1975.
- [72] J. L. Arrondo, A. Mugo, J. Castresana, and F. M. Goni. Quantitative studies of the structure of proteins in solution by fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. molec. Biol.*, 59:23–56, 1993.
- [73] G. C. Pimentel and A. L. McClellan. *The Hydrogen Bond*, chapter 3. Reinhold, 1960, New York.
- [74] J. O. Alben and F. G. Fiamingrifo. *Optical Techniques in Biological Research*, pages 133–179. Academic, Orlando, 1984.

- [75] J. Jakeš and S. Krimm. A valence force field for the amide group. *Spectrochimica Acta Part A*, 27:19–34, 1971.
- [76] J. Jakeš and S. Krimm. Normal coordinate analyses of molecules with the amide group. *Spectrochimica Acta Part A*, 27:35–63, 1971.
- [77] S. Krimm. Vibrational analysis of conformation in peptides, polypeptides, and proteins. *Biopolymers*, 22:217–225, 1983.
- [78] A. Elliot and E. J. Ambrose. *Nature*, 165:921–922, 1950.
- [79] U. P. Fringeli and Hs. H. Günthard. *Membrane Spectroscopy*, pages 270–332. Springer, Berlin, 1981.
- [80] T. Miyazawa and E. R. Blout. The infrared spectra of polypeptides in various conformations: Amide I and II bands. *Journal of the American Chemical Society*, 83:712–719, 1961.
- [81] R. D. B. Fraser and T. P. McRae. *Conformations in Fibrous Proteins and Related Synthetic Polypeptides*, pages 95–125. Academic Press, New York, 1973.
- [82] R. C. Lord and R. Mendelsohn. *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics 31: Membrane Spectroscopy*, chapter Raman Spectroscopy of Membrane Constituents and Related Molecules, pages 377–436. Springer Verlag; Berlin, 1981.
- [83] H. A. Gebbie and G. A. Vanasse. Interferometric spectroscopy in the far infra-red. *Nature*, 178:432, 1956.
- [84] J. W. Cooley and J. W. Tukey. An algorithm for the machine calculation of complex fourier series. *Mathematics of Computation*, 19(90):297–301, 1965.
- [85] P. R. Griffiths. *Chemical Infrared Fourier Transform Spectroscopy*. John Wiley & Sons New York, 1975.
- [86] D. Baurecht. Methoden der zeitaufgelösten Fourier-Transform-Infrarot-(FTIR) Spektroskopie. Technical report, Institut für Biophysikalische Chemie, Universität Wien, 1997.

- [87] T. Nakano, T. Yokoyama, and H. Toriumi. One- and two-dimensional infrared time-resolved spectroscopy using a step-scan FT-IR spectrometer: Application to the study of liquid crystal reorientation dynamics. *Applied Spectroscopy*, 47:1354–1366, 1993.
- [88] N. J. Harrick. *Internal Reflection Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Inc., 1967.
- [89] M. Born and E. Wolf. *Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*. Pergamon Press, Oxford, 1983.
- [90] A. Hartstein, J. R. Kirtley, and J. C. Tsang. Enhancement of the infrared absorption from molecular monolayers with thin metal overlayers. *Physical Review Letters*, 45:201–204, 1980.
- [91] E. Johnson and R. Aroca. Surface-enhanced infrared spectroscopy of monolayers. *Journal of Chemical Physics*, 99:9325–9330, 1995.
- [92] G. C. Papavassiliou. Optical properties of small inorganic and organic metal particles. *Progress in Solid State Chemistry*, 12:185–271, 1979.
- [93] M. Osawa, K. Ataka, K. Yoshii, and Y. Nishikawa. Surface-enhanced infrared spectroscopy: The origin of the absorption enhancement and band selection rule in the infrared spectra of molecules adsorbed on fine metal particles. *Applied Spectroscopy*, 47:1497–1502, 1993.
- [94] H. Miyake, S. Ye, and M. Osawa. Electroless deposition of gold thin films on silicon for surface-enhanced infrared spectroelectrochemistry. *Electrochemistry Communications*, 4:973–977, 2002.
- [95] D. Baurecht and U. P. Fringeli. Quantitative modulated excitation Fourier transform infrared spectroscopy. *Review of Scientific Instruments*, 72:3782–3792, 2001.
- [96] W. Mäntele. *Biophysical Techniques in Photosynthesis*. Kluwer Academic, 1996.
- [97] B. O. Seraphim. Proceedings on the 1st conference on modulation spectroscopy. 1973.

LITERATURVERZEICHNIS

- [98] U. P. Fringeli, H. H. Günthard, and D. Baurecht. *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*. Marcel Dekker, New York, 2000.
- [99] U. P. Fringeli. *Internal Reflection Spectroscopy, Theory and Applications*. Marcel Dekker, New York, 1992.
- [100] U. P. Fringeli. PCT, WO 97/08598. International Patent Application, PCT, WO, 1997.
- [101] D. Baurecht, W. Neuhäuser, and U. P. Fringeli. Modification of time-resolved step-scan and rapid-scan FTIR spectroscopy for modulation spectroscopy in the frequency range from Hz to kHz. *AIP Conference Proceedings*, 430:367, 1996.
- [102] M. Müller, R. Buchet, and U. P. Fringeli. 2D-FTIR ATR spectroscopy of thermo-induced periodic secondary structural changes of poly-(l)-lysine: A cross-correlation analysis of phase-resolved temperature modulation spectra. *Journal of Physical Chemistry*, 100:10810, 1996.
- [103] Macdonald. *Impedance Spectroscopy*. John Wiley & Sons, 1987.
- [104] A. Bard and L. Faulkner. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. John Wiley and Sons.
- [105] Jürgen Heinze. Cyclovoltammetrie - die Spektroskopie des Elektrochemikers. *Angewandte Chemie*, 96(11):823–840, 1984.
- [106] R. A. Marcus. On the theory of electron-transfer reactions. VI. Unified treatment for homogeneous and electrode reactions. *The Journal of Chemical Physics*, 43:679–701, 1965.
- [107] J. E. B. Randles. A cathode ray polarograph. Part II. The current-voltage curves. *Transactions of the Faraday Society*, 44:327 – 338, 1948.
- [108] A. Sevcik. Oscillographic polarography with triangular voltage. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 13:349–377, 1948.
- [109] R. H. Ritchie. Plasma losses by fast electrons in thin films. *Physical Review*, 106(5):874–, June 1957.

- [110] T. Turbadar. Complete absorption of light by thin metal films. *Proceedings of the Physical Society*, 73(1):40–44, 1959.
- [111] Andreas Otto. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei*, V216(4):398–410, August 1968.
- [112] E Kretschmann and H. Raether. Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light (surface plasma waves excitation by light and decay into photons applied to nonradiative modes). *Zeitschrift für Naturforschung*, 23A:2135, 2136, 1968.
- [113] Wolfgang Knoll. Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves. *Annual Review of Physical Chemistry*, 49(1):569–638, 1998.
- [114] Benno Rothenhausler, Jürgen Rabe, Peter Korpiun, and Wolfgang Knoll. On the decay of plasmon surface polaritons at smooth and rough ag-air interfaces: A reflectance and photo-acoustic study. *Surface Science*, 137(1):373–383, February 1984.
- [115] John David Jackson. *Classical Electrodynamics*. John Wiley & Sons, New York, 1998.
- [116] Jiri Homola. Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377(3):528–539, October 2003.
- [117] I. Pockrand. Surface plasma oscillations at silver surfaces with thin transparent and absorbing coatings. *Surface Science*, 72(3):577–588, April 1978.
- [118] J. M. Vanderkooi, G. Maniara, T. J. Green, and D. F. Wilson. An optical method for measurement of dioxygen concentration based upon quenching of phosphorescence. *Journal of Biological Chemistry*, 262(12):5476–5482, April 1987.
- [119] H. R. Pelham and R. J. Jackson. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *European Journal of Biochemistry*, 67 Issue 1:247–256, 1976.
- [120] Marilyn Kozak. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Research*, 15(20):8125–8148, 1987.

- [121] E. T. Kreis and H. F. Lodish. Oligomerization is essential for transport of vesicular stomatitis viral glycoprotein to the cell surface. *Cell*, 46 Issue 6:929–937, 1986.
- [122] H. Lauer. *Die molekulare Architektur von Thiopeptid- und Thiolipopeptidmonoschichten auf Goldoberflächen und ihre Verwendung als Spacersysteme für festkörpergestützte Lipiddoppelschichten*. PhD thesis, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, 2001.
- [123] W.J. Miller and N.L. Abbott. Influence of van der Waals forces from metallic substrates on fluids supported on self-assembled monolayers formed from alkanethiols. *Langmuir*, 13(26):7106–7114, 1997.
- [124] S. Schiller, R. Naumann, K. Lovejoy, H. Kunz, and W. Knoll. Archaea-analoge Thiolipide für gestützte Lipiddoppelschichtmembranen auf ultraglaten Goldoberflächen. *Angewandte Chemie*, 115 Nr. 2:219, 2003.
- [125] P. Harder, M. Grunze, R. Dahint, G.M. Whitesides, and P.E. Laibinis. Molecular conformation in oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold and silver surfaces determines their ability to resist protein adsorption. *Journal of Physical Chemistry B*, 102(2):426–436, 1998.
- [126] A.J. Pertsin, M. Grunze, and I.A. Garbuzova. Low-energy configurations of methoxy triethylene glycol terminated alkanethiol self-assembled monolayers and their relevance to protein adsorption. *Journal of Physical Chemistry B*, 102(25):4918–4926, 1998.
- [127] D.J. Vanderah, J. Arsenault, H. La, R.S. Gates, V. Silin, C.W. Meuse, and G. Valincius. Structural variations and ordering conditions for the self-assembled monolayers of $\text{HS}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{3-6}\text{CH}_3$. *Langmuir*, 19(9):3752–3756, 2003.
- [128] M. Zwahlen, S. Herrwerth, W. Eck, M. Grunze, and G. Hahner. Conformational order in oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold determined by soft X-ray absorption. *Langmuir*, 19(22):9305–9310, 2003.

- [129] D.J. Vanderah, T. Parr, V. Silin, C.W. Meuse, R.S. Gates, H. La, and G. Valincius. Isostructural self-assembled monolayers. 2. Methyl 1-(3-Mercaptopropyl)-oligo(ethylene oxide)s. *Langmuir*, 20(4):1311–1316, 2004.
- [130] J. Kunze, R. Naumann, S. Schiller, W. Knoll, and J. Lipkowski. In situ pm ftirras studies of an archaea analogue thiolipid assembled on Au(111). Submitted to *Langmuir*.
- [131] R. Naumann, D. Walz, S. Schiller, and W. Knoll. Kinetics of valinomycin-mediated K^+ ion transport through tethered bilayer lipid membranes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 550-551:241, 2003.
- [132] A. Janshoff and C. Steinem. Transport across artificial membranes—an analytical perspective. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385 Nr.3:1618–2642, 2006.
- [133] J. Kunze, J. Leitch, A.L. Schwan, R.J. Faragher, R. Naumann, S. Schiller, W. Knoll, J.R. Dutcher, and J. Lipkowski. New method to measure packing densities of self-assembled thiolipid monolayers. *Langmuir*, 22(12):5509–5519, 2006.
- [134] L. K. Tamm and S. A. Tatulian. Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 30, 4:365–429, 1997.
- [135] J. N. Israelachvili. *Intermolecular and Surface Forces: With Applications to Colloidal and Biological Systems*. Academic Press; 2nd ed., 1991.
- [136] M. D. Thomson, W. M. Burnham, and D. E. C. Cole. The G protein-coupled receptors: Pharmacogenetics and disease. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 42:311–389, 2005.
- [137] R. Robelek, E.S. Lemker, B. Wiltschi, V. Kirste, R. Naumann, D. Oesterheld, and E. Sinner. Inkorporation von in-vitro synthetisierten G-Proteingekoppelten Rezeptoren in ein peptidfixiertes artifizielles Membransystem. *Angewandte Chemie*, 119 Issue 4:611–614, 2007.

LITERATURVERZEICHNIS

- [138] K. Raming, J. Krieger, J. Strotmann, I. Boekhoff, S. Kubick, C. Baumstark, and H. Breer. Cloning and expression of odorant receptors. *Nature*, 361:353–356, 1993.
- [139] C. Tanford. *Physical Chemistry of Macromolecules*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1963.
- [140] www.wikipedia.de.
- [141] Jürgen Worm. Winspall- Auswertesoftware für Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie, 2006.
- [142] R. Pethig. *Dielectric and Electronic Properties of Biological Materials*. John Wiley and Sons, 1979.
- [143] H. T. Tien and A. L. Diana. *Chemistry and Physics of Lipids*, pages 55–101. 1968.
- [144] *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. International Union of Pure and Applied Chemistry.
- [145] S. Yu. Venyaminov and N. N. Kalnin. Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H_2O) solutions. II. amide absorption bands of polypeptides and fibrous proteins in alpha-, beta-, and random coil conformations. *Biopolymers*, 30:1259–1271, 1990.
- [146] M. Osawa. Surface-enhanced infrared absorption spectroscopy. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, pages 785–799, 2002.
- [147] S. Sivasankar, S. Subramaniam, and D. Leckband. Direct molecular level measurements of the electrostatic properties of a protein surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95:12961–12966, 1998.
- [148] P. E. Smith, R. M. Brunne, A. E. Mark, and W. F. van Gunsteren. Dielectric properties of trypsin inhibitor and lysozyme calculated from molecular dynamics simulations. *Journal of Physical Chemistry*, 97:2009–2014, 1993.

- [149] W. Knoll, K. Morigaki, R. Naumann, B. Saccà, S. Schiller, and E.-K. Sinner. *Ultrathin Electrochemical Chemo- and Biosensors*, chapter functional tethered bilayer lipid membranes, pages 239–254. Springer, 2004.
- [150] H Wackerbarth, U Klar, W Gunther, and P. Hildebrandt. Novel time-resolved surface-enhanced (resonance) Raman spectroscopic technique for studying the dynamics of interfacial processes: Application to the electron transfer reaction of cytochrome c at a silver electrode. *Applied Spectroscopy*, 53(3):283, 1999.
- [151] M. G. Friedrich, F. Gieß, R. Naumann, W. Knoll, K. Ataka, J. Heberle, J. Hrabakova, D. H. Murgida, and P. Hildebrandt. Active site structure and redox processes of cytochrome c oxidase immobilised in a novel biomimetic lipid membrane on an electrode. *Chemical Communications*, pages 2376–2377, 2004.
- [152] D. Baurecht, I. Porth, and U. P. Fringeli. A new method of sensitive detection in modulation spectroscopy applied to temperature induced folding and unfolding of rnase a. *Vibrational Spectroscopy*, 30:85–92, 2002.
- [153] M. Schwarzott, P. Lasch, D. Baurecht, D. Naumann, and U. P. Fringeli. Electric field-induced changes in lipids investigated by modulated excitation ftir spectroscopy. *Biophysical Journal*, 86:285–295, 2004.
- [154] Andreas Scheller. Wasplas- Messsoftware für Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie.