
**Spektroelektrochemische Untersuchungen mittels
oberflächenverstärkter Infrarotabsorptionsspektroskopie
(SEIRAS) an Multi-Redox-Center-Proteinen in einer
biomimetischen Membranumgebung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der

Johannes-Gutenberg-Universität

Mainz

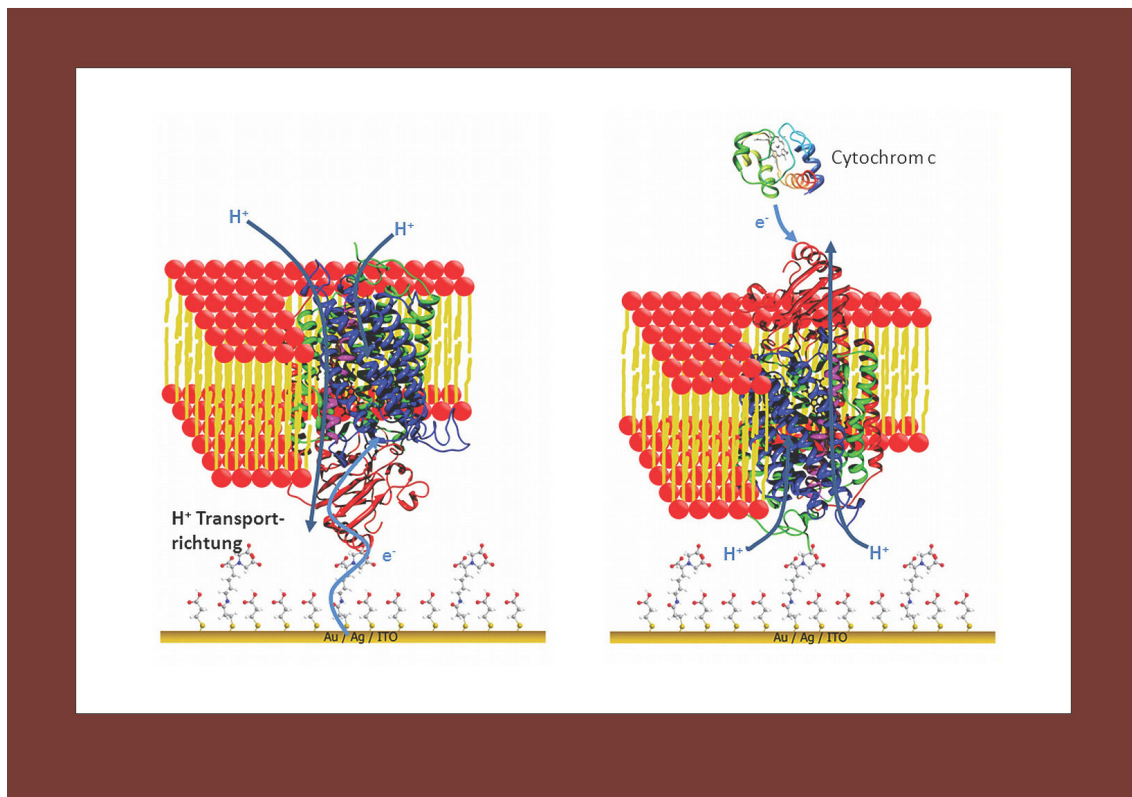
Christoph Nowak

geb. in Pirmasens

Mainz, Juni 2010

DOKTORARBEIT

Christoph Nowak



Ich versichere, dass ich meine Doktorarbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, am 07. Juni 2010

(Christoph Nowak)

Kapitel 1.....	1
Einleitung.....	1
Kapitel 2.....	7
Motivation.....	7
Kapitel 3.....	13
Cytochrom c und die Cytochrom c Oxidase, Proteine der Atmungskette.....	13
3.1 Die Zellmembran und Membranproteine.....	15
3.2 Die Atmungskette.....	17
3.3 Das Cytochrom c.....	22
3.4 Die Cytochrom c Oxidase.....	24
3.5 Elektronentranslokationswege und Intermediate der Cytochrom c Oxidase.....	27
3.6 Protonentranslokationswege der Cytochrom c Oxidase.....	33
3.7 Die protein-verankerte Lipid-Membran.....	36
Kapitel 4.....	41
Infrarotspektroskopie.....	41
4.1 FTIR-Spektroskopie.....	43
4.2 Infrarotspektroskopie an Proteinen.....	48
4.3 Bandenanalyse.....	51
4.4 Zwei-Dimensionale Infrarot (2D IR) Spektroskopie.....	52
4.4.1 Synchrone 2D-Korrelationsspektren.....	56
4.4.2 Asynchrone 2D-Korrelationsspektren.....	59
4.5 ATR-FTIR-Spektroskopie.....	61
4.5.1 Totalreflexion.....	61
4.5.2 Die evaneszente Welle.....	63
4.5.3 Eindringtiefe der evaneszenten Welle.....	67
4.5.4 Oberflächenverstärkte ATR-FTIR-Spektroskopie.....	68
4.6 Zeitaufgelöste Messungen.....	71
4.6.1 Rapid-Scan-Mode.....	71
4.6.2 Step-Scan-Mode.....	72
4.7 Phasensensitive Detektion bei Modulationsangeregter FT-IR-Spektroskopie.....	73
4.7.1 Grundlagen der phasensensitiven Detektion.....	73
4.7.2 Modulierte Anregung.....	75
4.7.3 Fourieranalyse.....	77
4.7.4 Phasensensitive Detektion.....	80
4.7.5 PSD zeitaufgelöster Spektren.....	84
Kapitel 5.....	89
Elektrochemie.....	89
5.1 Zyklische Voltammetrie.....	91
5.2 Zyklische Voltammetrie gelöster Redox-Spezies.....	92
5.3 Cyclovoltammetrie an Schichten oberflächengebundener Redoxspezies.....	97
5.4 Elektrochemische Impedanzspektroskopie.....	98
5.5 Die elektrische Doppelschicht.....	100
5.6 Messprinzip der elektrochemischen Impedanzspektroskopie.....	102
Kapitel 6.....	109
Weitere Messmethoden.....	109
6.1 Rasterkraftmikroskopie (AFM).....	111
6.2 Dynamische Lichtstreuung.....	113
6.3 UV-Vis Spektroskopie.....	117

Kapitel 7.....	119
Messaufbau für Experimente der elektrochemisch gesteuerten ATR-FTIR-Spektroskopie	119
7.1 FTIR-Messaufbau	121
7.2 Der ATR-Kristall.....	121
7.3 Der Probenkammereinsatz und die spektroelektrochemische Messzelle	123
Kapitel 8.....	125
Ergebnisse & Diskussion Publikationen.....	125
Applied Spectroscopy, 63, 1068-1074 (2009)	127
J. Phys. Chem C, 113, 17698-17704 (2009)	135
J. Phys. Chem. C, 113, 2256-2262	136
Spectroscopy 24, 125-129 (2010).....	143
J. Phys. Chem. C, 113, 2256-2262 (2009).....	149
Spectroscopy 24, 173-176 (2010).....	155
J. Solid State Electrochem. (2010)	159
Soft Matter (under review).....	169
submitted to Biochemistry	181
J. Electroanalyt. Chem (under review)	209
submitted to Biophys. Journal.....	231
Kapitel 9.....	249
Zusammenfassung	249
Anhang.....	257
Proteinogene Aminosäuren	259
Zuordnung von IR-Banden zur Oxidoreduktion der einzelnen Redoxzentren der CcO	259
Glossar	263
Material & Geräte	265
Chemikalien	266
Weitere Materialien	268
Literaturverzeichnis	269

Kapitel 1

Einleitung

Lebende Organismen wandeln kontinuierlich Energie um u.a. für Prozesse wie Bewegung, aktiven Transport und Temperaturkontrolle. Im Laufe der Evolution hat sich nicht nur eine riesige Anzahl unterschiedlicher Organismen entwickelt, sondern auch die Nutzung unterschiedlicher Energiequellen weit verbreitet. Wärme scheidet als Energiequelle aus, da man zur Leistung von Arbeit einen Temperaturgradienten benötigt. Die direkte Nutzung von Lichtenergie ist ebenfalls nicht möglich, da die Lebenszeit z.B. eines angeregten Chlorophylls mit 10^{-10} s erheblich kürzer ist als die Reaktionen biologischer Prozesse. Pflanzen, Algen und Cyanobakterien sind in der Lage, durch Photosynthese die Energie der absorbierten Photonen in chemische Energie umzuwandeln. Während dieser Reaktion werden Elektronen von einem Wassermolekül durch die Absorption von Licht über das Photosystem (PS) II und PS I auf Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH) übertragen. Das Ergebnis ist ein Molekül mit einem stark negativen Reduktionspotential. Die Energie dieser Reduktionsäquivalente kann über weitere Reaktionsschritte zum Aufbau von reduzierten, organischen Verbindungen, wie z.B. Fetten oder Kohlenhydraten, genutzt werden. Diese Produkte haben den Vorteil, dass durch Oxidation die gespeicherte Energie jederzeit wieder nutzbar gemacht werden kann und dass im Vergleich zu einem angeregten Chlorophyll die Lebenszeit mit bis zu 10^8 s 18 Größenordnungen länger ist ¹.

Durch die Oxidation von einem Mol Glukose werden ungefähr 2800 kJ freigesetzt. Da biologische Reaktionen, wie z.B. die Bildung einer Peptidbindung (25 kJ/mol), erheblich kleinere Energieportionen benötigen, wäre die direkte Kopplung einer solchen Reaktion an die Oxidation von Glukose unwirtschaftlich. Aus diesem Grund gibt es Moleküle mit geringerer freier Energie wie NADH (200 kJ/mol), FADH_2 (140 kJ/mol) und Adenosintriphosphat (ATP) (55 kJ/mol), die bei der Oxidation von Glukose gebildet werden. Bei der Glykolyse werden zwei ATP und beim Durchlaufen des Citratzyklus weitere zwei ATP gebildet. ATP gilt als so genannte „universelle Energiewährung“ in der Zelle. Durch die oxidative Phosphorylierung kann man bis zu 32 weitere ATP Moleküle gewinnen. Hierbei werden die Elektronen der Reduktionsäquivalente in die Atmungskette eingeschleust und durch eine Reihe von Elektronen-Überträgern auf Sauerstoff übertragen (siehe Kapitel 3). Die im menschlichen Körper vorhandene Menge an ATP beträgt 50 mg, welche einem so enormen Umsatz unterliegen, dass dieser im Ruhezustand etwa 65 kg pro Tag entspricht ². Das ATP wird bei der Muskelkontraktion und anderen Zellbewegungen, beim aktiven Transport, der Signaltransduktion und bei der Biosynthese verbraucht.

Die primäre Energiequelle allen Lebens ist somit die Sonne. Diese Energiequelle direkt nutzen können allerdings nur autotrophe („sich selbst ernährende“) Organismen. Diese sind in der Lage, Sonnenenergie durch Photosynthese in chemische Energie umzuwandeln. Im Gegensatz dazu sind heterotrophe („sich fremd ernährende“) Organismen auf die Zufuhr von fett- oder kohlenhydratreicher Nahrung angewiesen, die sie dann ebenfalls durch „Atmung“ verbrauchen.

Vergleicht man die Photosynthese und die Atmungskette, so erkennt man auf molekularer Ebene viele Gemeinsamkeiten. Beispielsweise dient in beiden Reaktionen membranständiges Quinon als Elektronen-Überträger. Bei der Photosynthese leitet Plastoquinon die Elektronen vom Photosystem II auf Photosystem I weiter. Im Gegensatz dazu ist in der Atmungskette Ubiquinon für den Weitertransport der Elektronen vom Komplex I und II auf Komplex III verantwortlich. Ein Beispiel für die Ähnlichkeit beider Reaktionsketten liegt in der jeweiligen Schlüsselreaktion. Vergleicht man zum Einen die Bildung von Wasser im binuklearen Zentrum der Cytochrom c Oxidase und zum Anderen die Bildung von Sauerstoff im Mangancluster des Photosystems II, so sieht man bis hin zur Beteiligung einzelner Aminosäuren im Funktionszyklus große Übereinstimmungen³.

1931 erhielt Otto Warburg für seine grundlegenden Arbeiten über das „Atmungsferment“ den Nobelpreis. Doch erst gegen Ende der fünfziger Jahre gelang die Isolierung der Cytochrom c Oxidase. Seitdem wurden intensive Untersuchungen durchgeführt, um den Mechanismus der Sauerstoffreduktion zu Wasser und die daran gekoppelte Protonentranslokation über die Membran zu verstehen. Die Erkenntnisse sind bisher allerdings unbefriedigend, nicht zuletzt deshalb, weil die vier Metall-Redoxzentren fest in die Struktur des Proteins eingebettet sind, deren Aufklärung erst in jüngster Zeit begonnen wurde. Dabei entdeckte man, dass Cytochrom c Oxidase aus Bakterien nur aus zwei bis vier, der Enzymkomplex in Säugetieren aus dreizehn Protein-Untereinheiten besteht^{4,5}.

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*)⁶. 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. in 7-9). 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 behindert¹⁰. 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 Stabilität¹¹. 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 beheben¹²⁻¹⁵. tBLMs wurden dabei mit Oligoethylenglycol-Spacergruppen¹⁴ oder mit Peptidgruppen¹³ 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 ¹⁶, 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 Ni²⁺-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 ¹⁷⁻¹⁹ 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 simultan einzusetzen. Zudem sind Prozesse in kurzer Zeit reversibel durchführbar (< Millisekunden ¹⁹). Dies ist insbesondere für spektroskopische Anwendungen wichtig, da so hinreichend Signal aufakkumuliert werden kann.

Kapitel 2

Motivation

Obwohl die Struktur der Cytochrom c Oxidase mit Hilfe von Röntgenbeugung aufgeklärt werden konnte⁴, liefert die Methode nur ein statisches Bild des Enzyms. Um Struktur-Funktionszusammenhänge aufzuklären, benötigt man andere Methoden, zum Beispiel die IR-Spektroskopie.

Mit Hilfe kombinierter UV/Vis- und IR-spektroskopischer Untersuchungen des Enzyms gelang es einigen Arbeitsgruppen das Protein mittels potentiometrischer Titration zu untersuchen. Anhand dieser Messungen konnten Konformations-Änderungen im Protein in Abhängigkeit vom Redoxzustand beobachtet werden²⁰⁻²⁶.

Diese Messungen wurden jedoch stets an Proteinen in Lösung oder in unspezifischer Orientierung^{23, 24, 26, 27} durchgeführt. Um den Elektronentransport zu ermöglichen mussten Mediatoren verwendet werden^{26, 28}. Dadurch werden Elektronen auf die Redoxzentren des Proteins unabhängig voneinander übertragen. Bei der verwendeten Mediatorenlösung handelt es sich um eine Mischung aus Ferrocenen, Cyaniden und Naphtoquinonen, welche bei verschiedenen Potentialen Elektronen zu den Redox-Zentren der CcO transportieren.

Der direkte Elektronentransfer von der verwendeten Metalloberfläche zum Protein, ohne die Verwendung von Mediatoren, wurde erstmals in unserer Gruppe mittels ptBLM-System (Protein-tethered Bilayer Lipid Membrane; Protein-verankerte Lipiddoppelschichtmembran) beobachtet^{19, 29}. Das ptBLM-System wurde in unserer Gruppe entwickelt und ist in [16] ausführlich beschrieben. Dabei wird die CcO mit dem his-tag an der Untereinheit II an der Oberfläche immobilisiert und eine Membran rekonstituiert. In dieser Orientierung, ist das CuA der Oberfläche (Arbeitselektrode) zugewandt und kann somit Elektronen direkt entgegennehmen und an das folgende Redoxzentrum Häm a weiterleiten.

Wie in [16] erläutert bietet das ptBLM-System neue Möglichkeiten zur systematischen Untersuchung der Cytochrom c Oxidase, da diese in einer definierten Orientierung immobilisiert wird.

In [18, 19, 29] wurde die CcO mittels Elektrochemie und Raman-Spektroskopie untersucht. Anhand der elektrochemischen Messungen konnte gezeigt werden, dass vier Elektronen durch direkten Elektronentransfer an der kompletten Reduktion des in der ptBLM-Konfiguration immobilisierten Enzyms beteiligt sind. Durch potentiometrische Titration mittels Raman-Spektroskopie 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.

An dieser Stelle setzt die Infrarotspektroskopie an. Änderungen im Redoxzustand der jeweiligen Redoxzentren stehen in Verbindung mit einer Konformationsänderung der umgebenden Polypeptidgruppen. Die CONH-Gruppe des Polypeptidgerüsts von Proteinen besitzt charakteristische Schwingungen, die sich mittels Infrarotstrahlung anregen lassen.

In [16, 30] wurden erstmals oberflächenverstärkte infrarotspektroskopische Untersuchungen an der CcO in der ptBLM-Konfiguration durchgeführt. Diese Messungen wurden auf einer Oberfläche durchgeführt, welche durch „electroless deposition“ hergestellt wurde. Allerdings war diese Oberfläche nicht reproduzierbar und variierte in ihrer Schichtdicke unkontrolliert. Hinzu kam, dass diese Oberfläche äußerst instabil war und eine so große Rauigkeit besaß, dass die Membranbildung nur unzureichend stattfinden konnte. Anhand dieser Messungen konnte die Anbindung der Oxidase gezeigt werden. Allerdings waren die in [30] immobilisierten Proteine instabil, was auf die unzureichende Membranbildung zurückzuführen ist, und wurden daher meist während den spektroelektrochemischen Messungen zerstört. Ebenso war Verstärkungsfaktor der verwendeten Goldoberfläche für die Monolagen zu klein. Aufgrund dieser Instabilitäten des Systems konnten IR-Spektren nicht reproduzierbar und mit einem unbefriedigenden Signal zu Rausch Verhältnis vermessen werden. Anhand von potentiometrischen Titrations konnten keine Aussagen über die Redoxzustände der vier Redoxzentren getätigt werden. Zeitaufgelöste Messungen zur Ermittlung der kinetischen Konstanten der Elektronenübertragung zwischen den einzelnen Redoxzentren waren nur schwer möglich, da das gesamte System über die Dauer der Messungen nicht stabil genug war³⁰.

Daher ist es wichtig, im Rahmen dieser Promotion zunächst eine Oberfläche zu entwickeln, welche mehrere Kriterien erfüllt:

Die Oberfläche muss kompatibel zu den zu untersuchenden Proteinen sein, elektrische Leitfähigkeit für elektrochemische Experimente aufweisen, sowie einen großen Oberflächenverstärkungseffekt aufweisen, um ein besseres Signal zu Rausch Verhältnis in den spektroskopischen Messungen zu erhalten. Für die Bestimmung des Oberflächenverstärkungseffekt wird Cytochrom c (CC) als „Testprotein“ verwendet. Dieses Protein ist bereits sehr gut untersucht, seine Infrarot-Spektren sind bekannt und die

Elektrochemie dieses Proteins verstanden außerdem zeichnet sich Cytochrom c durch seine kommerzielle Verfügbarkeit aus. Cytochrom c kann durch elektrostatische Wechselwirkung auf der Oberfläche immobilisiert und in situ elektrochemisch reduziert werden. Daher kann es sehr gut als Vergleichssystem zur Optimierung des Verstärkungsfaktors dienen.

Durch Kontrolle der Oberflächenrauigkeit soll die Bildung der Membranen vereinfacht werden. Eine niedrigere Rauigkeit wird zu stabileren Membranen führen.

Ein weiterer Punkt, der zu Beginn der hier vorliegenden Promotion aufgegriffen werden muss, ist die Optimierung des Linkers zur Anbindung der CcO. Dabei soll das DTNTA-Molekül (Dithiobis (nitriloacetic acid butylamidyl propionat) nicht mehr in-situ sondern ex-situ synthetisiert werden. Durch die ex-situ Synthese des DTNTA besteht die Möglichkeit die Oberflächenbelegung und damit die Proteinkonzentration im verwendeten ptBLM-System besser zu kontrollieren. Mit dem aufgereinigten DTNTA muss dann eine Verdünnungsstudie auf der neu entwickelten nanostrukturierten Goldoberfläche durchgeführt werden, um das optimale Verdünnungsverhältnis für die Bildung einer stabilen Membran im ptBLM-System zu finden. An dieser Stelle muss noch einmal darauf hingewiesen werden, dass die Packungsdichte ein sehr zentraler Parameter für die Funktionsweise von Proteinen ist.

Auf Grundlage diese neu entwickelten Systems soll dann die Oxidase unter „turnover“ Bedingungen untersucht werden. Hierzu muss der direkte Elektronentransfer zu den vier Redoxzentren verwirklicht werden. Es muß dann festgestellt werden, ob der Elektronentransfer sequentiell ist und ob die beobachteten Konformationsänderungen der CcO mit und ohne die sonst verwendeten Mediatoren gleich sind bzw. worin sie sich unterscheiden.

Dies soll zunächst in Form einer potentiometrischen Titration geschehen. In [19] konnte anhand der elektrochemischen Messungen gezeigt werden, dass die Redoxpotentiale der CcO sich während elektrochemischer Messungen zu negativeren Potentialen hin verschieben. Die Verschiebung des Redoxpotentials der CcO deutet auf zwei Formen der Oxidase hin, welche als „pulsed“- und „resting-state“ aus der Literatur bekannt sind^{19, 21}. Interessant ist es nun zu sehen, ob man diese beiden Formen der Oxidase auch in den potentiometrischen Titrationen im IR beobachten kann. Dies wäre das erste Mal, dass man die beiden Formen der Oxidase spektroskopisch auflösen kann. Eine weitere Frage in diesem Zusammenhang wäre dann auch, welche Strukturänderungen mit dem beschriebenen Potentialshift einhergehen.

Im nächsten Schritt sollen dann zeitaufgelöste Spektren der CcO aufgenommen werden. Mit Hilfe dieser zeitaufgelösten Messungen sollen dann kinetische Konstanten der einzelnen Redoxzentren ermittelt werden, wobei auch untersucht werden soll, ob es einen Unterschied zwischen den kinetischen Konstanten der „aktivierten“ („pulsed-state“) und „nicht aktivierten“ („resting-state“) Oxidase gibt. Bisher sind nur Arbeiten bekannt, in welchen die CcO mittels CO-Photodissociation zeitaufgelöst vermessen worden ist. Diese Messungen an der CcO lieferten Zeitaufösungen im Millisekundenbereich^{31, 32}. Dazu wurde mit photoinduziertem Ladungstransfer gearbeitet, wodurch immer nur eine einzige Anregung möglich war. Der vollständige Enzymzyklus konnte bei solchen Messungen nicht durchlaufen werden

In der ptBLM-Konfiguration, mit direktem Elektronentransfer, 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. Das Protein kann unter anaeroben wie auch aeroben Bedingungen („turnover“) in-situ untersucht werden.

Kapitel 3

Cytochrom c und die Cytochrom c Oxidase, Proteine der Atmungskette

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, 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, Pflanzen und Pilze) übernimmt diese Funktion die Zellwand. 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, was in Abbildung 3.1.1(b) gezeigt wird. Ein Phospholipid besteht aus zwei hydrophoben Fettsäureketten, einer Glycerol-Gruppe, einem Phosphat und einem Alkohol (siehe 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 Zellwand eingebettet, Cholesterol-Moleküle stabilisieren die Membran (siehe Abbildung 3.1.1(c)). Diese Darstellung einer Zellmembran mit Membranproteinen zeigt, dass es verschiedene 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 Kohlenstoffketten 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 andere nicht kovalente Wechselwirkung an die Lipidmembran oder ein integrales Membranprotein angebunden.

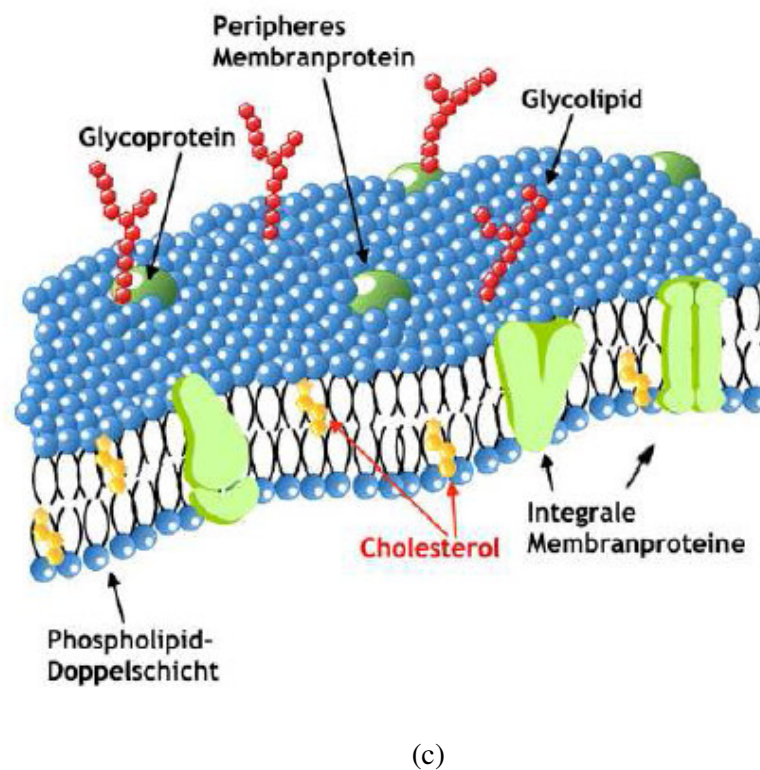
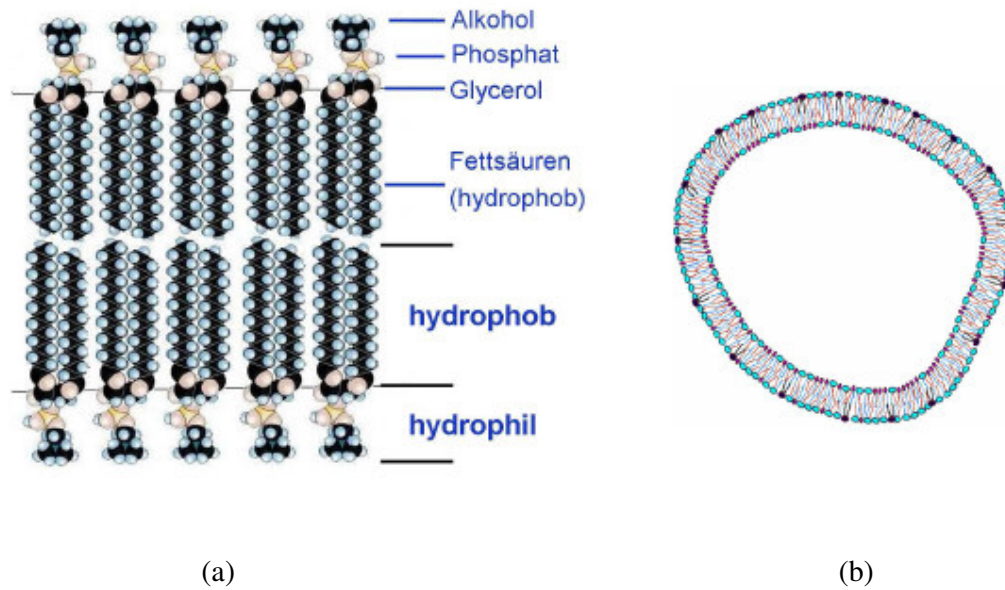


Abb.3.1.1: (a) Die Phospholipidmembran. Phospholipide lagern sich durch hydrophobe Wechselwirkungen der Fettsäuren zu einer Doppelschicht mit hydrophiler Außenseite zusammen; (b) schematische Darstellung einer Zelle mit Zellmembran; (c) detaillierte Darstellung einer Zellmembran mit Membranproteinen und weiteren Bestandteilen.

3.2 Die Atmungskette

Die bei der Glykolyse, der Fettsäureoxidation und im Citratzyklus entstehenden NADH und FADH₂ sind energiereiche Moleküle, da sie jeweils ein Elektronenpaar mit hohem Übertragungspotential besitzen. Wenn diese Elektronen zur Reduktion von Molekularem Sauerstoff zu Wasser benutzt werden, wird sehr viel Energie frei, die zur ATP-Erzeugung verwendet werden kann. Dieser Prozess wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet; er liefert ATP, wenn Elektronen von NADH oder FADH₂ über eine Reihe von Elektronen-Carriern auf O₂ übertragen werden. Die oxidative Phosphorylierung findet in den Mitochondrien statt und stellt in aeroben Organismen die Hauptquelle für ATP dar (siehe Abb. 3.2.1).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Georges Palade und Fritjof Sjöstrand enthüllten, dass Mitochondrien zwei Membransysteme besitzen: eine äußere Membran und eine ausgedehnte, stark gefaltete innere Membran. Die innere Membran ist durch eine Anzahl von Einstülpungen gefaltet, die als Cristae bezeichnet werden. Es gibt also zwei Kompartimente in Mitochondrien: erstens einen Intermembranraum zwischen der äußeren und der inneren Membran und zweitens die Matrix, die von der inneren Membran begrenzt wird. Die oxidative Phosphorylierung findet in der inneren Mitochondrienmembran statt, im Gegensatz zu den meisten Reaktionen des Citratzyklus und der Fettsäureoxidation, die in der Matrix ablaufen.

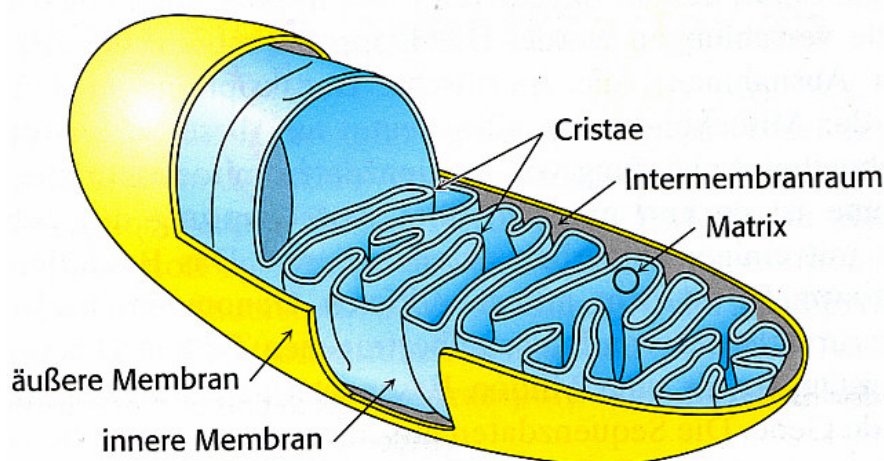


Abb.3.2.1: Schematische Darstellung eines Mitochondriums³³.

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.

Zum Beispiel liefert die oxidative Phosphorylierung 26 der 30 Moleküle ATP, die bei der vollständigen Oxidation von Glucose zu CO_2 und H_2O entstehen.

Die oxidative Phosphorylierung ist im Konzept einfach, im Mechanismus jedoch komplex. Der Fluss von Elektronen von NADH oder FADH_2 auf O_2 durch eine Reihe von Proteinkomplexen, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, führt dazu, dass Protonen aus der mitochondrialen Matrix herausgepumpt werden:



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 durch³⁴:

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

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

$$= \underbrace{\Delta G^{\circ} + RT \ln \frac{[\text{NAD}^+][\text{H}_2\text{O}]}{[\text{NADH}][\text{H}^+][\frac{1}{2}\text{O}_2]}}_{\text{Chem. Umsetzung}} + \underbrace{RT \ln 10(p\text{H}_{\text{außen}} - p\text{H}_{\text{innen}})}_{\Delta\mu_{\text{H}^+}} + nF\Delta\Phi_m \quad (3.2.4)$$

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 resultierende ungleiche Verteilung der Protonen führt zu einer pH-Differenz und einem Transmembranpotenzial, in anderen Worten eine protonenmotorische Kraft.

Die freie Enthalpie, die bei der chemischen Umsetzung von NADH und O₂ zu NAD⁺ und H₂O frei wird, beträgt -220 kJ/mol³³. 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:

$$\begin{aligned} \Delta\mu_{H^+} &= RT \ln 10 (pH_{\text{außen}} - pH_{\text{innen}}) + nF\Delta\Phi_m \\ &= 8,315 * 10^{-3} \frac{\text{kJ}}{\text{mol} * \text{K}} * 310\text{K} * 2,303 * 1,4 + \left(1 * 96,49 \frac{\text{kJ}}{\text{mol} * \text{V}} * 0,14\text{V} \right) \quad (3.2.5) \\ &= 21,82 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \end{aligned}$$

Bei zehn gepumpten Protonen pro Zyklus ändert sich die freie Enthalpie damit um 10 * 21,82 kJ/mol = 218,2 kJ/mol. Dies ist nur geringfügig weniger als die 220 kJ/mol, die bei der Umsetzung von NADH und O₂ zu NAD⁺ und H₂O frei werden.

Von NADH werden die Elektronen auf O₂ 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). Diese großen Transmembrankomplexe besitzen eine Vielzahl von Oxidations-Reduktions-Zentren, die Chinonen, Flavine, Eisen-Schwefel-Cluster, Hämgruppen und Kupferionen enthalten.

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 übertragen. Q wird auch als Ubichinon bezeichnet, da es in biologischen Systemen ein ubiquitäres Chinon ist. Ubichinon überträgt auch die von der Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus erzeugten Elektronen des FADH₂ auf die Q-Cytochrom-c-Oxidoreduktase, und zwar durch die Succinat-Q-Reduktase (Komplex II). Das Cytochrom c, ein kleines wasserlösliches Protein, überträgt dann die Elektronen vom Komplex III zur Cytochrom c Oxidase (Komplex IV), der letzten Komponente der Kette, die die Reduktion des O₂ katalysiert.

Kapitel 3 Cytochrom c und die Cytochrom c Oxidase, Proteine der Atmungskette

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.

Die abschließende Phase der oxidativen Phosphorylierung wird von der ATP-Synthase ausgeführt, einer ATP-synthetisierenden Anordnung, die durch den Protonenrückfluss in die Mitochondrienmatrix angetrieben wird.³³ In Abbildung 3.2.2 wird die mitochondriale Atmungskette in der inneren Mitochondrien-Membran gezeigt.

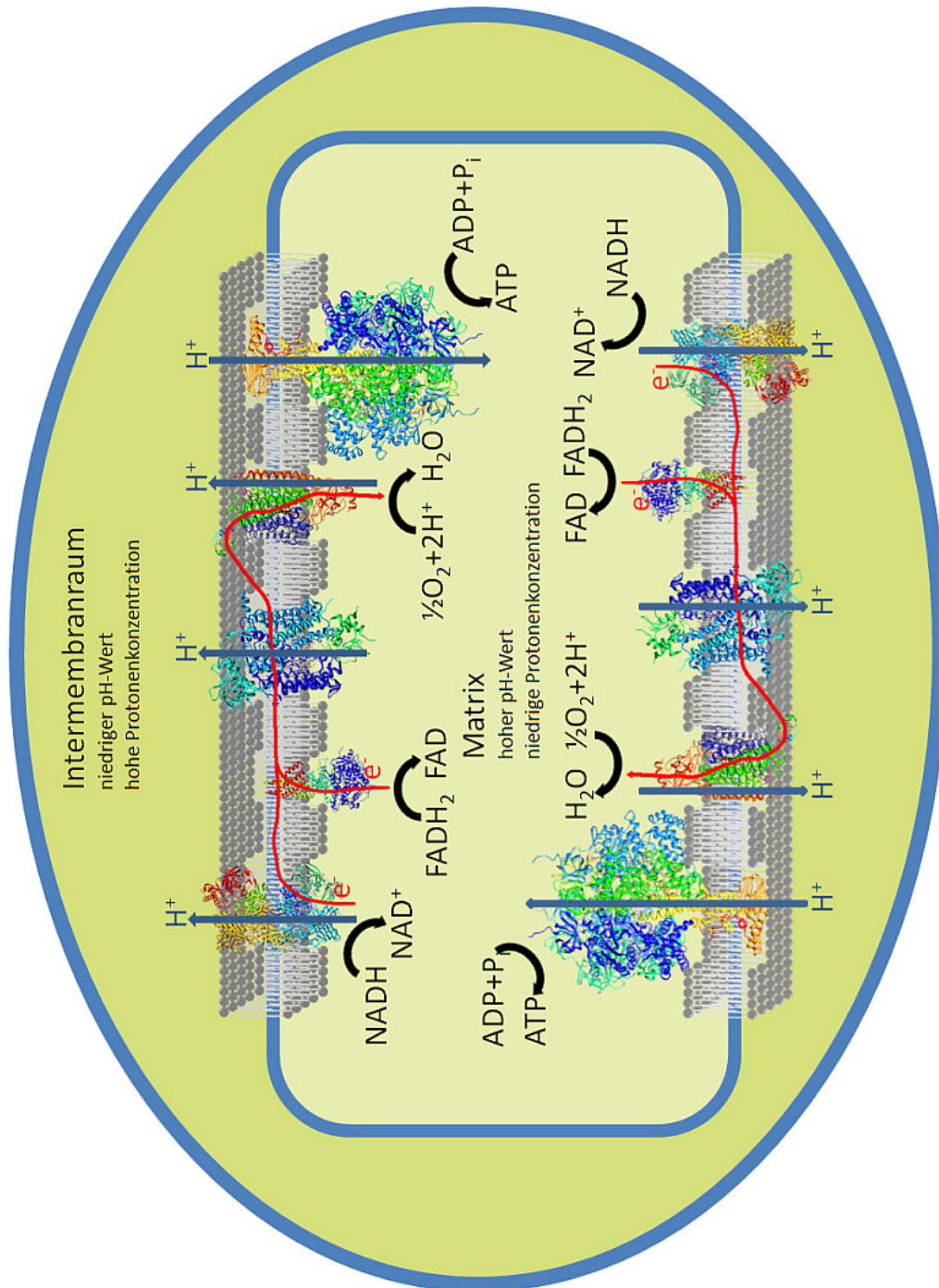


Abb. 3.2.2: Die mitochondriale Atmungskette in der inneren Mitochondrien-Membran. Sie besteht aus einer Elektronentransportkette (Komplexe I-IV) und der ATP-Synthase (Komplex V). Elektronen werden von NADH oder von FADH₂ auf den Sauerstoff übertragen, um Energie für die Bildung von ATP zu gewinnen.

3.3 Das Cytochrom c

Cytochrom sind ubiquitär verbreitete redoxaktive Proteine, die als prosthetische Gruppe ein Häm enthalten. Sie spielen eine außerordentlich wichtige Rolle in Elektronentransportvorgängen und sind seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung. Die Cytochrom c Strukturen von Rinderherz und Thunfisch wurden bereits in den frühen 70er Jahren mittels Röntgenstrukturanalyse erforscht^{35, 36}. Im Jahre 1990 gelang Bushnell die Aufklärung der 3D-Struktur von Rinderherz Cytochrom c in einer sehr hohen Auflösung³⁷. Cytochrom vom c-Typ enthalten eine kovalent gebundene Häm-Gruppe, die über zwei Thioetherbrücken zwischen zwischen den Thiolgruppen der Cysteine und den Vinylgruppen des Porphyrinrings an das konservierte Sequenzmotiv CXXCH (mit X einer beliebigen Aminosäure)³⁸ gebunden ist. Die Imidazolgruppe des Histidins in diesem Motiv ist ein Ligand des Häm-Eisens³⁹. Als sechster Ligand dient normalerweise ein weiteres Histidin oder ein Methionin. Als Beispiel für ein Cytochrom c wird das Cytochrom c aus Rinderherz in Abbildung 3.3.1 gezeigt, welches im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde.

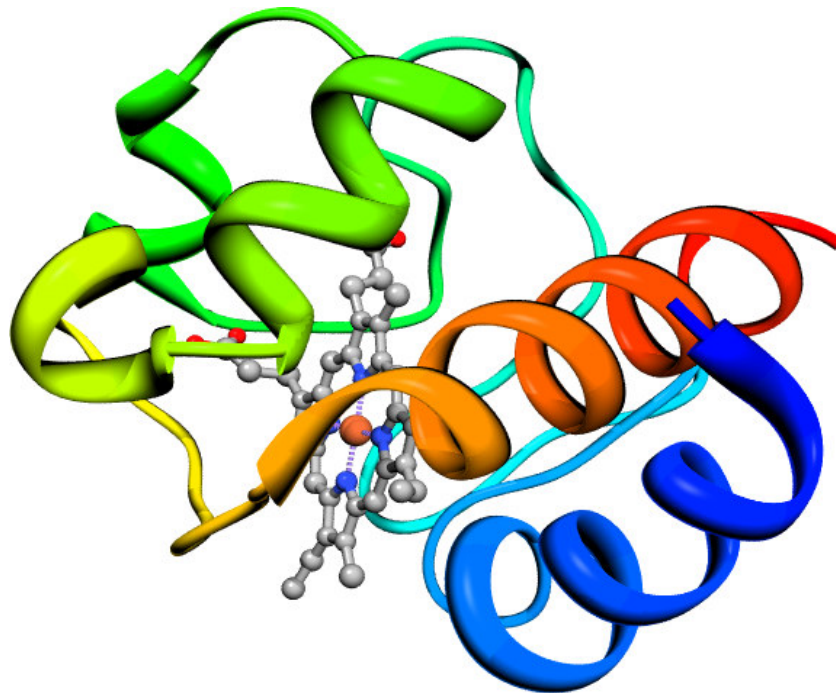


Abb. 3.3.1a: Cytochrom c aus Rinderherz, Struktur des Proteins mit Sekundärstruktur-Elementen.

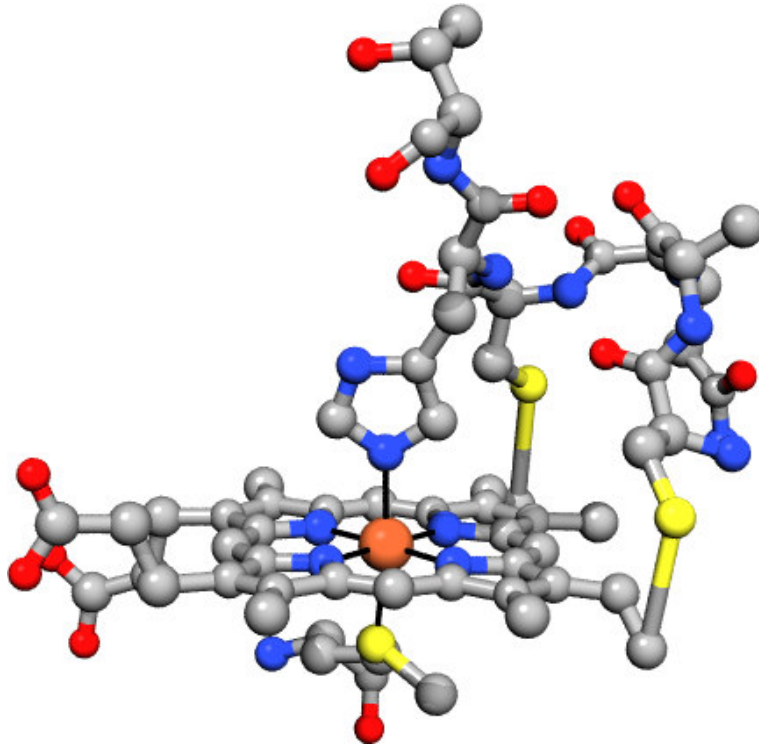


Abb. 3.3.1b: Cytochrom c aus Rinderherz, mit den Aminosäuren des CXXCH-Motivs, den Histidin- und Methionin-Lianden.

Cytochrome sind lösliche oder membrangebundene Proteine und auf der p-Seite (positiv) von Membranen lokalisiert, d.h. im Periplasma von Bakterien, im Intermembranraum von Mitochondrien und im Lumen von Chloroplasten und Cyanobakterien. Die n-Seite (negativ) der Membran ist dementsprechend der Matrixraum. Eine besondere Rolle spielen Cytochrome in membranassoziierten Elektronentransportketten wie bei der Atmungskette. Während Ubichinon als mobiler Elektronencarrier in der Membran fungiert, dient das lösliche Cytochrom c als mobiler Ein-Elektronencarrier auf der p-Seite der Membran.

Die Funktion des Cytochrom c blieb für mehr als eine Milliarde Jahre lang erhalten, wie sich aus Beobachtungen ergibt, dass das Cytochrom c jeder Eukaryotenart *in vitro* mit der Cytochrom c Oxidase jeder anderen bisher untersuchten Art reagiert. Ferner sind einige prokaryotische Cytochrome, etwa das Cytochrom c_2 eines photosynthetisch aktiven Bakteriums und das Cytochrom c_{550} eines denitrifizierenden Bakteriums, dem Cytochrom c aus den Mitochondrien des Thunfischherzens sehr ähnlich. Diese Zeugnisse beweisen, dass die strukturellen und funktionellen Eigenschaften des Cytochroms c eine effiziente Lösung des Elektronentransports darstellen³³.

3.4 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 H_2O Molekülen gekoppelt. Diese Reaktion wird von der Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) katalysiert. Die Struktur der in dieser Arbeit untersuchten bakteriellen Cytochrom c Oxidase ist in Abbildung 3.4.1a und b sowie 3.4.2 dargestellt.

Die in dieser Arbeit untersuchte Cytochrom c Oxidase stammt aus *Rhodobacter spheroides*, einem prokaryotischen Organismus. Die Untereinheitenstruktur bakterieller Atmungskettenenzyme ist weitaus einfacher aufgebaut, als die mitochondrialer Proteine. Ein weiterer Vorteil in der Verwendung prokaryotischer Atmungskettenenzyme liegt darin begründet, dass diese Systeme einfacher auf genetischer Ebene verändert werden können. Trotz des einfacheren strukturellen Aufbaus weisen die bakteriellen Proteinkomplexe sehr starke Homologien zu denen der mitochondrialen Atmungskette auf, ebenso ist die Funktionsweise der prokaryotischen Atmungskette die gleiche wie die der eukaryotischen Atmungskette. Aus diesem Grund können Ergebnisse der Untersuchungen von Cytochrom c Oxidase von *Rhodobacter sphaeroides* 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. Robert B. Gennis, University of Illinois und Prof. Shelagh Ferguson-Miller, Michigan State University, zur Verfügung gestellt.

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, Max-Planck-Institut für Biochemie, Frankfurt, zur Verfügung gestellt.

Die ortsspezifische Mutagenese der Cytochrom c Oxidase mit Anfügen eines Histidin-Ankers ist in [40] beschrieben.

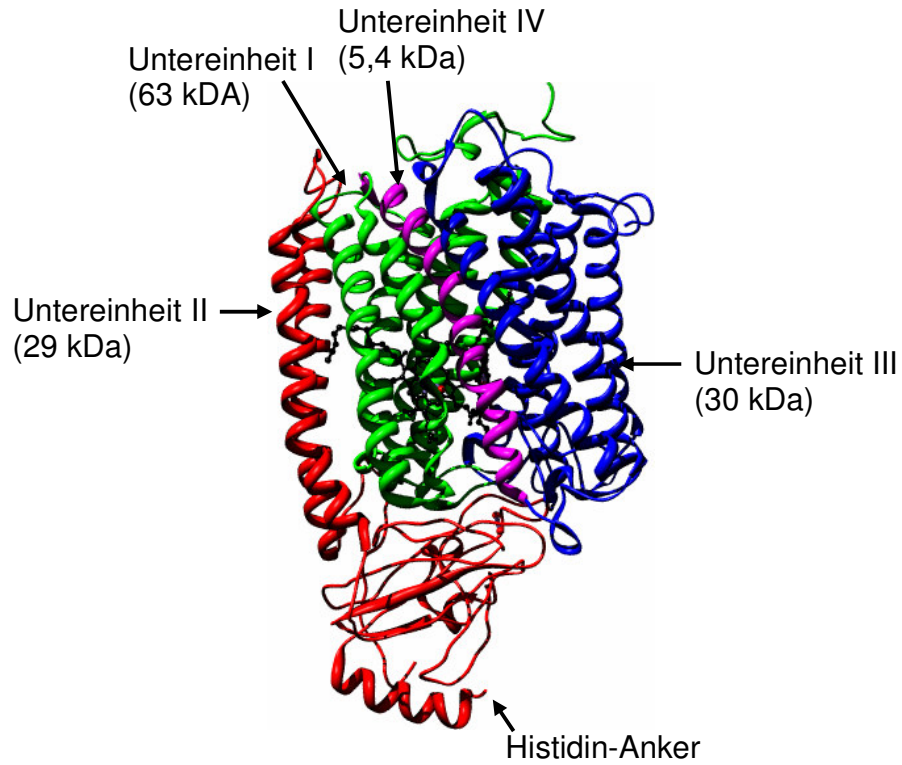


Abb. 3.4.1a: Die bakterielle Cytochrom c Oxidase in der „down“-Konfiguration

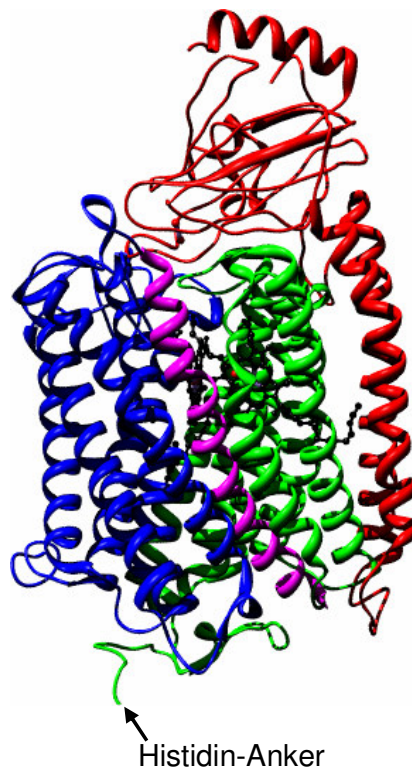


Abb. 3.4.1b: Die bakterielle Cytochrom c Oxidase in der „up“-Konfiguration

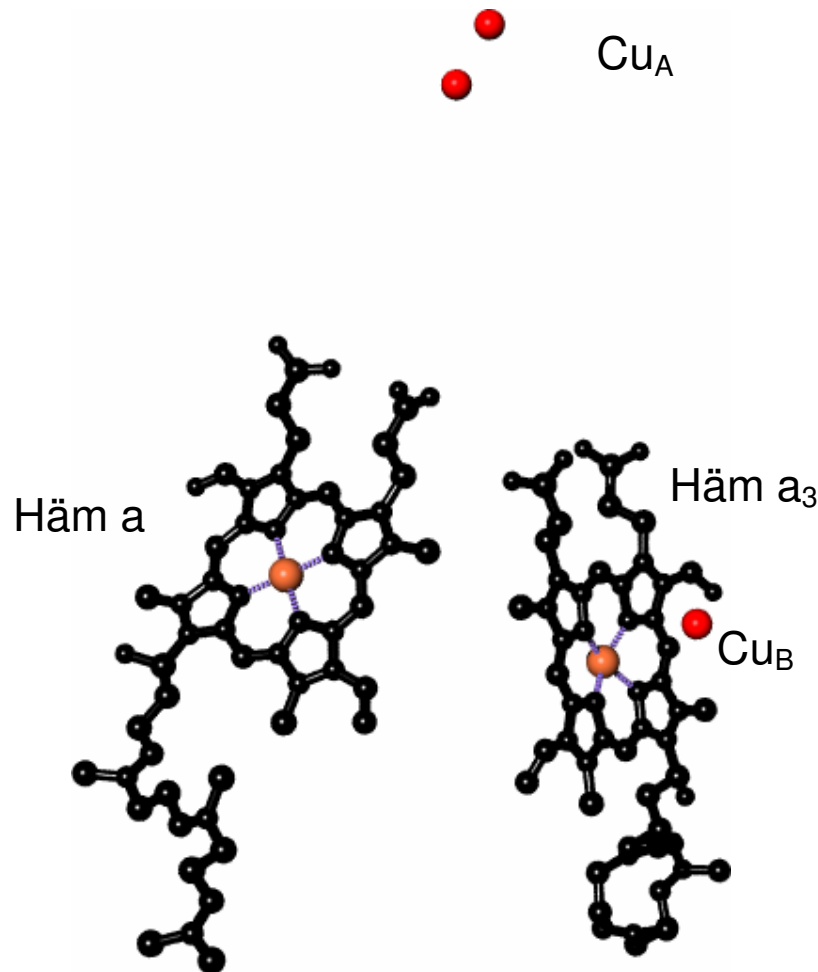


Abb.3.4.2: Vergrößerung der vier Redoxzentren. Die Cytochrom c Oxidase beinhaltet zwei Häm- und zwei Cu-Zentren.

In [41] ist die Strukturauflösung der Cytochrom c Oxidase in der Auflösung von 2,3 Å beschrieben. Die entsprechenden Daten zur Struktur der Cytochrom c Oxidase sind in der Proteindatenbank PDB unter dem Code 1M56 zugänglich und wurden für die Darstellung des Proteins in dieser Arbeit verwendet⁴².

Der Histidin-Anker, mit dem das Enzym immobilisiert wird, wird mittels Genmanipulation entweder an das C-terminale Ende von Untereinheit II („down“-Konfiguration) oder an das C-terminale Ende von Untereinheit I („up“-Konfiguration) angefügt.

Die Cytochrom c Oxidase enthält zwei Häm a Gruppen und drei Kupferionen in zwei Kupferzentren, die als Cu_A und Cu_B bezeichnet werden. Das Cu_A besteht aus zwei Kupferionen welche über zwei brückenbildende Cysteinreste miteinander verbunden sind.

3.5 Elektronentranslokationswege und Intermediate der Cytochrom c Oxidase

Dieses Zentrum nimmt zuerst vom reduzierten Cytochrom c die Elektronen auf. Das verbleibende Kupferion Cu_B ist mit drei Histidinresten koordiniert, wovon einer durch eine kovalente Bindung an einen Tyrosinrest modifiziert ist. Das Häm a unterscheidet sich von den Hämgruppen im Cytochrom c in drei entscheidenden Dingen:

Zuerst ersetzt eine Formylgruppe eine Methylgruppe, zweitens ist eine der Vinylgruppen durch eine C_{15} -Kohlenwasserstoffkette ersetzt worden und zu letzt ist das Häm nicht kovalent an das Protein gebunden.

Obwohl die beiden Hämmoleküle Häm a und Häm a_3 chemisch völlig identisch sind, besitzen sie dennoch unterschiedliche Eigenschaften, da sie an verschiedenen Stellen in der Cytochrom c Oxidase angeordnet sind. Während das Häm a das zweite Redox-Zentrum in der Elektronentransferkaskade der Cytochrom c Oxidase ist, also die Elektronen vom Cu_A übernimmt, transportiert das Häm a_3 als drittes Redox-Zentrum, Elektronen zum Cu_B , mit dem es direkt benachbart ist.

Zusammen bilden Häm a_3 und das Cu_B das aktive Zentrum, in dem O_2 zu H_2O reduziert wird³³.

3.5 Elektronentranslokationswege und Intermediate der Cytochrom c Oxidase

Die Bildung der Intermediate des katalytischen Zyklus der Cytochrom c Oxidase ist von der Einspeisung von Elektronen ins binukleare Zentrum, von der Protonenaufnahme aus dem Medium, der Bildung von Wasser und vier Protonenpumpschritten abhängig. Im katalytischen Zyklus müssen Elektronen- und Protonentransfer funktionell miteinander gekoppelt sein. Über die Frage, wie genau die Cytochrom c Oxidase diese Kopplung bewerkstelligt, konnte bis heute keine Einigung erzielt werden, daher ist der katalytische Zyklus der Cytochrom c Oxidase seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Dabei wurde eine Fülle von Daten über die Struktur der aus dem Zyklus vorkommenden Intermediate gewonnen^{43, 44, 45}.

Der Reaktionszyklus lässt sich grob in zwei Abschnitte unterteilen: den reduktiven und den oxidativen Teil. Der reduktive Teil beinhaltet den Übergang vom Zustand **O**, bei dem alle Redoxzentren oxidiert sind, zum Zustand **R**. Dieser ist dadurch charakterisiert, dass durch die Aufnahme von zwei Elektronen das binukleare Zentrum (Häm a_3 und Cu_B) reduziert vorliegt. Darüber hinaus werden bei diesem Übergang zwei Protonen aufgenommen^{46, 22}. Dieses wird

dadurch belegt, dass die Geschwindigkeitskonstante der Reduktion mit steigendem pH sinkt^{47, 48, 49}. Die Aufnahme der Protonen ist notwendig, um die überschüssigen Ladungen, welche durch den Elektronentransfer in das binukleare Zentrum eingeführt, zu kompensieren. In der Literatur wurde anfangs diskutiert, dass der K-Kanal, welcher im folgenden Abschnitt erklärt wird, für den oxidativen und der D-Kanal, welcher ebenfalls im folgenden Abschnitt beschrieben wird, für den reduktiven Abschnitt des Reaktionszyklus zuständig sei²¹. Neuere Ergebnisse zeigen allerdings, dass der D-Kanal ebenfalls in den reduktiven Teil des Reaktionszyklus involviert ist⁵⁰, ebenso ist die Protonenaufnahme vom **O** zu dem **R** Zustand noch immer nicht sicher geklärt⁵⁰.

Der oxidative Teil beginnt mit der Anlagerung von Sauerstoff an das reduzierte Häm a_3 (**R**→**A**). Der nächste Schritt ist nun abhängig davon, ob man die Reaktion mit der vollreduzierten (Cu_A^{1+} , a^{2+} , a_3^{2+} , Cu_B^{1+} ; **A**→**P_R**) oder halbreduzierten Oxidase (Cu_A^{2+} , a_3^+ , a_3^{2+} , Cu_B^{1+} ; **A**→**P_M**) durchführt. Ist die Cytochrom c Oxidase im vollreduzierten Zustand, so werden vier Elektronen auf den Sauerstoff übertragen, wobei je ein Elektron vom Häm a und Cu_B kommt und zwei Elektronen vom Häm a_3 stammen.

Im halbreduzierten Zustand werden ebenfalls vier Elektronen auf den Sauerstoff übertragen. Es stellt sich allerdings die Frage, woher das vierte Elektron kommt, da Häm a oxidiert ist. Eine Mögliche Quelle, nicht nur für ein Elektron, sondern auch für ein Proton, ist ein Tyrosin (Y288), welches durch Radikalbildung beides freisetzen könnte. Bei der Rinderherzoxidase bildet dieses Tyrosin eine kovalente Bindung mit einem Cu_B -Liganden (H284), was nicht bei der Cytochrom c Oxidase Struktur von *Rhodobacter sphaeroides* beobachtet wurde. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass sich beim Übergang in den Zustand **P** ein Radikal bildet^{51, 52}. Die Radikalbildung findet nicht nur im halbreduzierten Zustand statt, sondern auch im vollreduzierten. Hier wird die Radikalbildung allerdings direkt durch das bei Häm a vorhandene Elektron rückgängig gemacht. Sowohl im halbreduzierten als auch im vollreduzierten Zustand wird die Sauerstoffbindung beim Übergang von **A** nach **P_M** bzw. **P_R** gebrochen, wodurch ein Oxoferryl-Zustand gebildet wird. Ältere Untersuchungen hatten vorgeschlagen, dass die Bindung bei diesem Übergang intakt bleibt und der Sauerstoff in Form eines Peroxids am Häm a_3 gebunden vorliegt, was diesem Zustand auch seinen Namen **P** gab. Der Übergang von **A** nach **P** ist in beiden Fällen pH-unabhängig, und weist damit darauf hin, dass während dieser Reaktion keine Protonen aufgenommen werden⁵³. Interessanterweise haben beide **P** Intermediate identische UV/Vis-Spektren. Die Struktur bzw. die Umgebung der Chromophore beider Intermediate ist folglich vergleichbar⁵⁴.

3.5 Elektronentranslokationswege und Intermediate der Cytochrom c Oxidase

Im Falle der halbreduzierten Oxidase stoppt die Reaktion hier. Bei der vollreduzierten Oxidase zerfällt das Intermediat allerdings unter der Aufnahme eines Protons von E286⁵⁵ aus dem D-Kanal zum Intermediat **F**. Neben der Protonenaufnahme ist die (Re-) Reduktion des Häm a durch Cu_A noch charakteristisch für diesen Übergang. Der Unterschied zwischen **P** und **F** wird deutlich bei der Betrachtung der UV/Vis-Spektren. Das **F** minus **O** Spektrum zeigt eine breite Absorption bei 580 nm, während das **P** minus **O** Spektrum eine scharfe Bande bei 607 nm hat.

Der letzte Schritt im Funktionszyklus ist der **F**→**O** Übergang. Hierbei wird wiederum ein Proton durch den D-Kanal aufgenommen und das letzte Elektron zum binuklearen Zentrum transportiert. Sowohl Elektron als auch Proton werden zur Reduktion bzw. Protonierung des Oxoferryl-Komplexes eingesetzt ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}_2^- + e^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{Fe}^{3+}-\text{OH}$; wobei die Hydroxylgruppe auch an das Cu_B gebunden sein könnte).

In Abbildung 3.5.1 wird ein möglicher katalytischer Zyklus der Cytochrom c Oxidase gezeigt.

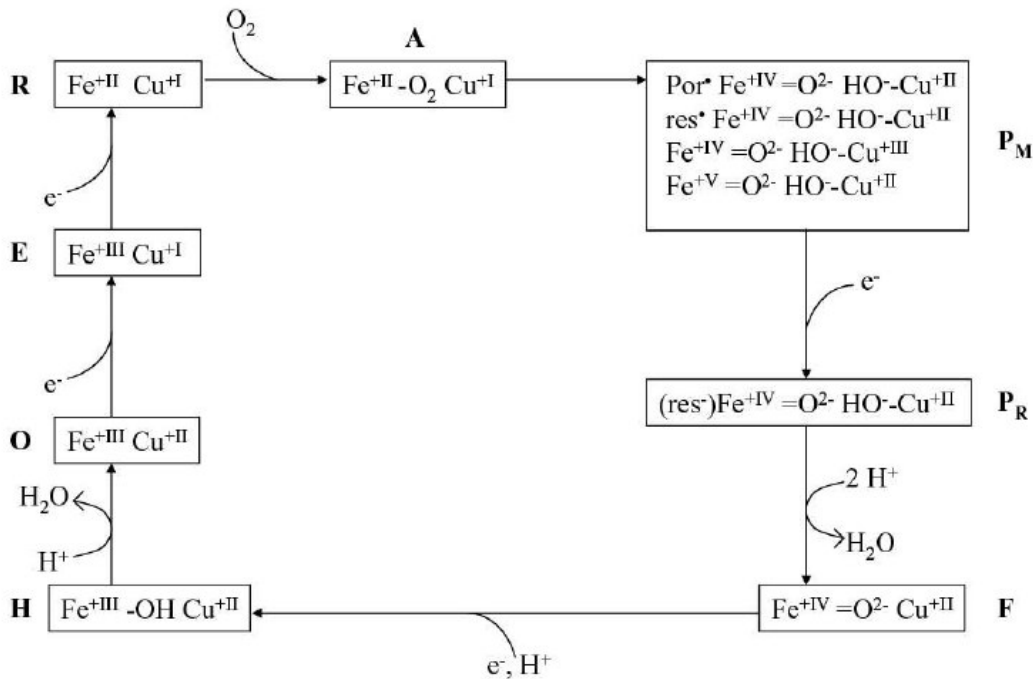
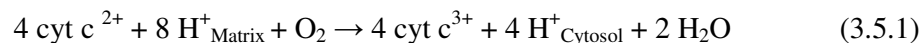


Abb. 3.5.1: Katalytischer Zyklus der Cytochrom c Oxidase. Dargestellt ist jeweils die Konfiguration des aktiven Zentrums (Häm a₃-Cu_B-Zentrum). Für das Intermediat **P_M** sind alternative Strukturen aufgeführt, die in der aktuellen Forschung diskutiert werden⁵⁰.

Eine Möglichkeit, diese Intermediate zu beobachten, bietet die flow-flash-Technik. Hierbei werden zwei getrennte Kammern zum einen gefüllt mit vollreduzierter, CO gebundener Cytochrom c Oxidase und zum anderen mit Sauerstoffgesättigter Lösung. Beide Lösungen werden anschließend in eine Mischkammer gepumpt. Um zu vermeiden, dass das an der Oxidase gebundene CO durch den in der Lösung vorhandenen Sauerstoff unkontrolliert ausgetauscht wird, muss die Vermischung sehr schnell erfolgen (< 1 s). Ist dieses gewährleistet, kann die Reaktion durch einen Laserpuls gestartet werden: Das CO wird fotolysiert, der Sauerstoff bindet an das Protein und der Funktionszyklus wird durchlaufen⁵⁶⁻⁵⁸. Da in diesem Fall der gesamte Funktionszyklus abläuft, können die Intermediate nur zeitaufgelöst beobachtet werden.

Bisher ist nicht eindeutig geklärt, welche Schritte im Funktionszyklus mit Protonenabgabe und infolgedessen mit dem eigentlichen Pumpvorgang assoziiert sind. 1977 gelang Wikström der Nachweis, dass bei der Cytochrom c Oxidase zusätzlich zu den für die chemische Reaktion der Wasserbildung verbrauchte Protonen noch vier weitere Protonen gepumpt werden^{20, 59}. 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:



1989 veröffentlichte Wikström das erste Kopplungsmodell für den katalytischen Zyklus der Cytochrom c Oxidase⁶⁰. 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) umkehrbar ist. Daraus folgerte er, dass sämtliche Protonen in diesem Teil des katalytischen Zyklus gepumpt werden müssen (siehe dazu Abbildung 3.5.2a).

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 ist⁶¹. Eines der vier gepumpten Protonen wird nach dieser Modellvorstellung (siehe Abbildung 3.5.2b) im Reduktiven Teil (**E**→**R** Übergang) des katalytischen Zyklus transferiert⁶².

Darauf hin antworteten Wikström und Verkhovsky mit einem neuen Modell⁶³. Nach diesem Modell werden die Hälfte der transferierten Protonen im reduktiven Teil des katalytischen

3.5 Elektronentranslokationswege und Intermediate der Cytochrom c Oxidase

Zyklus gepumpt, wenn zuvor der oxidative Teil des Zyklus durchlaufen wurde (siehe Abbildung 3.5.2c). 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.

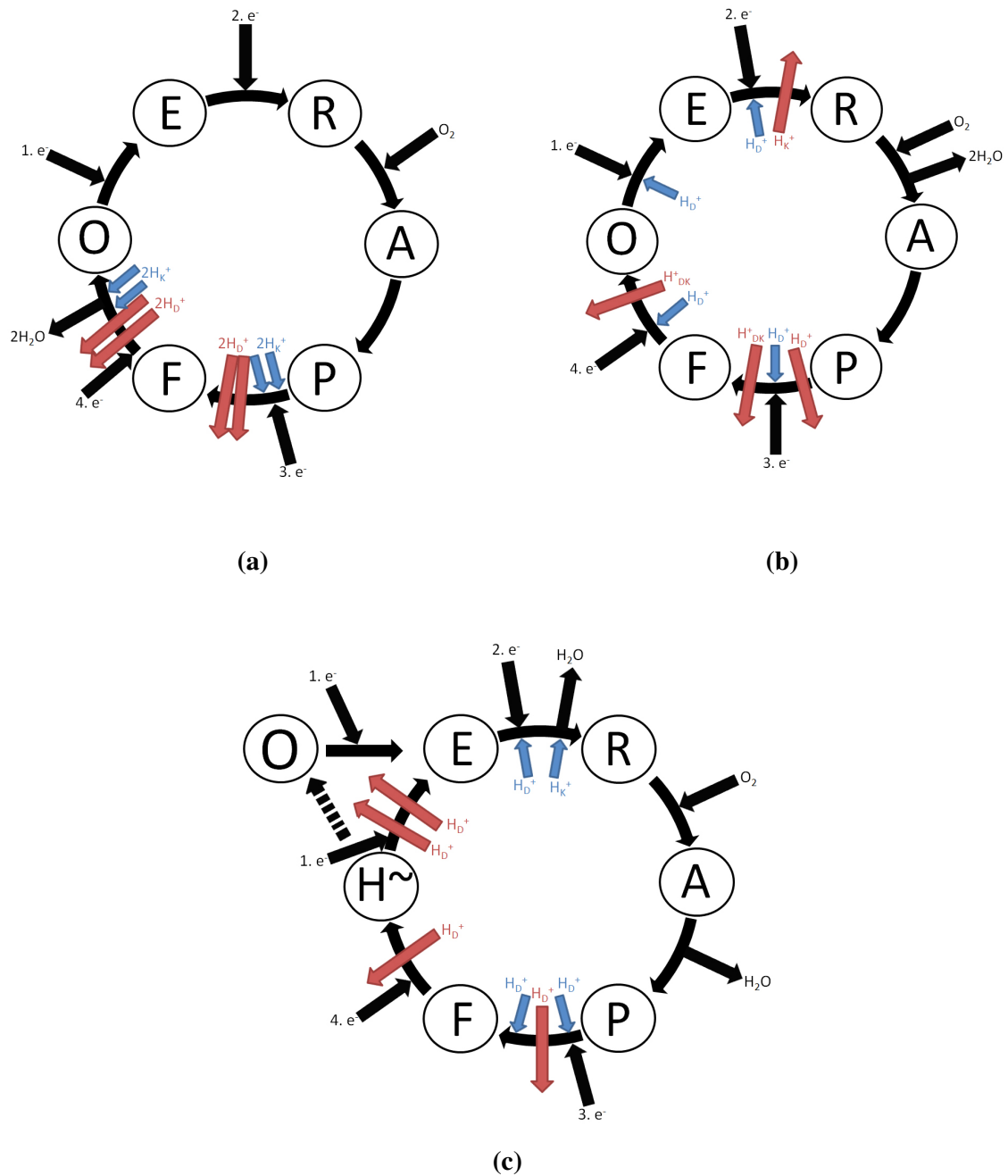


Abb.3.5.2: Modellvorstellungen des katalytischen Zyklus der Cytochrom c Oxidase:

(a) Wikström 1989, (b) Michel 1998, (c) Wikström 2000; Blaue Pfeile bezeichnen die Aufnahme von Substratprotonen, rote Pfeile beschreiben Protonenpumpschritte. D = D-Weg, K = K-Weg, e^- = Elektron.

3.6 Protonentranslokationswege der Cytochrom c Oxidase

Während der Reduktion des Sauerstoffs werden vier Protonen benötigt. Da der Ort der Sauerstoffchemie, das binukleare Zentrum, etwa 30 Å entfernt von der N-Seite liegt, muss im Protein mindestens ein Kanal vorhanden sein, durch den Protonen gelangen können. Charakteristisch für solche Kanäle sind polare Aminosäuren, Wassermoleküle und Wasserstoffbrückenbindungen, entlang derer sich ein Proton zum Ort der Sauerstoffreduktion bewegen kann. Darüber hinaus müssen noch vier weitere Protonen von der N-Seite aufgenommen und durch das Protein transportiert werden. Anhand von Mutagenesestudien postulierte man zwei Kanäle⁶⁴⁻⁶⁶, welche später durch die Kristallstrukturen ergänzt und bestätigt wurden: den D-Kanal und den K-Kanal. Experimente haben gezeigt, dass beide Kanäle während des Funktionszyklus zur Protonenaufnahme genutzt werden. Mögliche Protonenaustrittskanäle werden in der Literatur diskutiert, sind aber bis heute nicht identifiziert^{67,68}.

D-Kanal

Dieser Kanal beginnt mit einem Aspartat (D132)^{*}, lokalisiert in Untereinheit I (UE I), das als möglicher Eintrittspunkt der Protonen gilt und dem Kanal seinen Namen gibt. Über zwei Asparagine (N139 und N121) und zwei Serine (S201 und S200) führt der Kanal zu einer Glutaminsäure (E286). Zwischen den Aminosäuren liegt eine Kette von hochgeordneten Wassermolekülen. Der Abstand vom E286 zum binuklearen Zentrum beträgt etwa 10 Å, und es ist nicht offensichtlich, wie Protonen diese Barriere überwinden können. Da es sich bei dieser Barriere um eine hydrophobe Tasche handelt, wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass mehrere ungeordnete und somit für die Röntgen-Kristallografie unsichtbare Wassermoleküle vorhanden sind⁶⁹. Da dieser Kanal sowohl für gepumpte als auch für chemische Protonen genutzt wird⁴⁷, muss es einen „Schalter“ geben, der unterscheidet, ob ein Proton zur P-Seite gepumpt werden soll oder bei der Reduktion von Sauerstoff eingesetzt wird. Für dieses Schalten der Protonen ist möglicherweise die Aminosäure E286 verantwortlich.

* D132 bedeutet, dass es sich hierbei um ein Aspartat mit der Nummer 132 handelt und dass diese AS auf der UE I liegt. Die Nummerierung erfolgt in allen Fällen nach der *Rhodobacter spheroides* Nummerierung. Für den seltenen Fall, dass eine im Text genannte AS nicht in der UE I lokalisiert ist, wird die UE durch eine hochgestellte, römische Ziffer veranschaulicht.

K-Kanal

Mögliche Eingänge zu diesem Kanal sind entweder ein Serin (S299) oder eine Glutaminsäure (E101^H), die auf der Untereinheit II (UE II) lokalisiert ist. Der Kanal führt weiter über ein Lysin (K362), das diesem Kanal den Namen gibt. Zwischen S299 und K362 erkennt man ein verbindendes Wassermolekül in der Struktur. Die Entfernung zur nächsten Aminosäure, einem Threonin (T359), ist etwa 9 Å. Man erkennt in der Struktur keine Wassermoleküle zwischen diesen beiden Aminosäuren. Molekulardynamik-Rechnungen haben gezeigt, dass das K362 allerdings so flexibel ist, dass es diese Lücke überbrücken kann⁶⁷. Der nächste Schritt erfolgt wieder über ein Wassermolekül zum Hydroxylrest der Farnesylseitenkette des Häm a₃. Das letzte Glied in dieser Kette ist ein Tyrosin (Y288), welches in der Nähe eines der Cu_B-Liganden liegt (H284).

Das während der Reduktion gebildete Wasser und die gepumpten Protonen benötigen einen Ausgang. Die Propionsäurereste der Hämgruppen, die am Pumpvorgang beteiligt sein sollen⁷⁰, bilden mit Hilfe einiger Arginine, dem Mg²⁺ und einiger Wassermoleküle ein Wasserstoffbrückennetzwerk, das bis zur P-Seite reicht. Dieses könnte eine Möglichkeit sein, das gebildete Wasser und die zu pumpenden Protonen abzugeben. Bis heute ist allerdings noch kein Kanal identifiziert worden^{8, 71}. In Abbildung 3.6.1 wird der Protonentranslokationsweg der Cytochrom c Oxidase von *Rhodobacter sphaeroides* gezeigt.

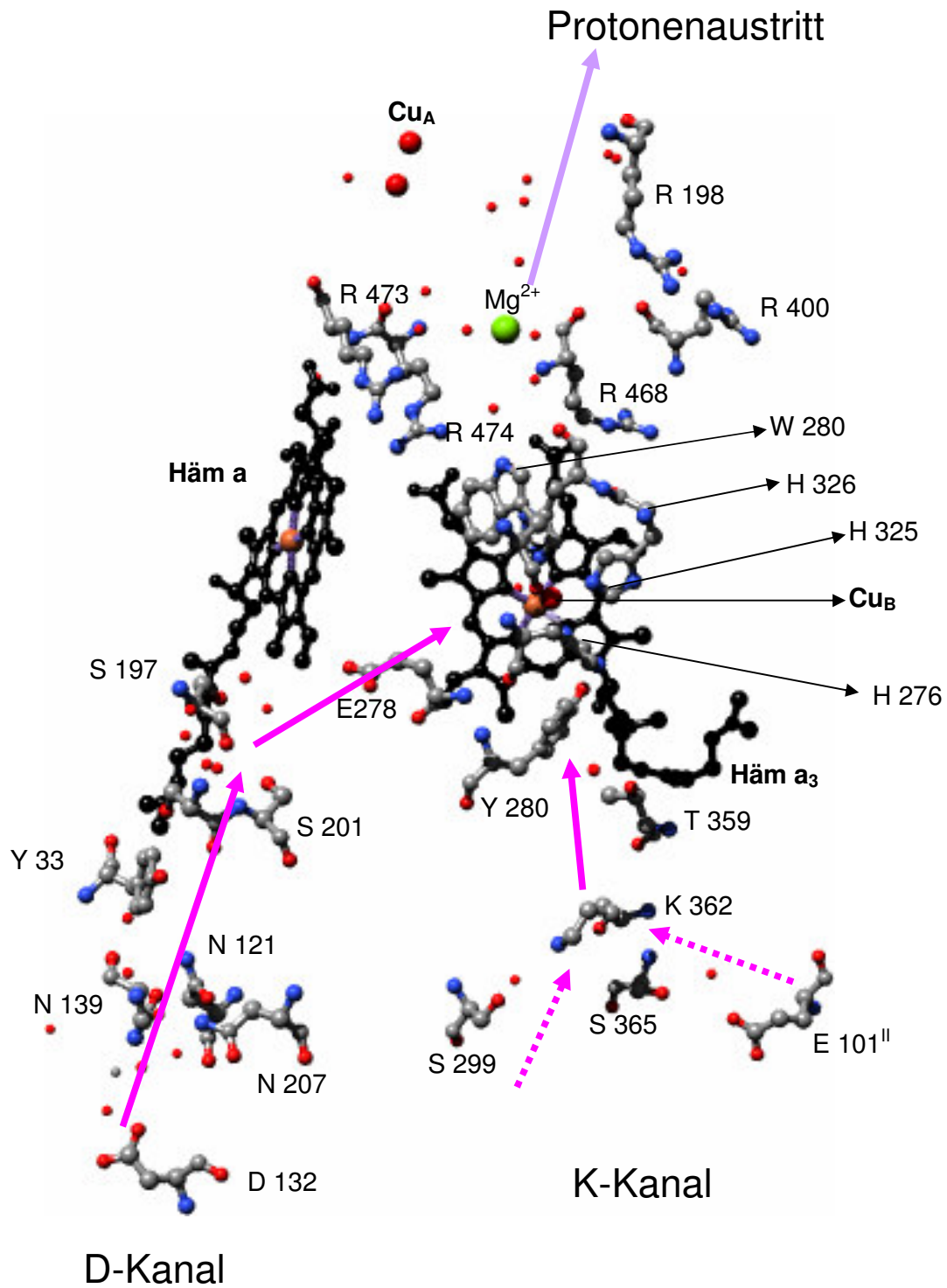


Abb. 3.6.1: D- und K-Kanal mit allen Aminosäuren, welche laut Literatur an dem Protonen austritt beteiligt sind. Zusätzlich sind die vier Redoxzentren der CcO dargestellt.

3.7 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, welche in [16, 19, 30, 72] ausführlich beschrieben sind, ist zum einen, dass zunächst passende lange Spacer-Moleküle gefunden werden müssen, zum anderen die Spacer-Moleküle selbst das Enzym bei seiner Enfaltung behindern und die Funktionalität einschränken können. Im Rahmen dieser Arbeit kommt die Methode der Protein-Immobilisierung zum Einsatz, die von unserer Gruppe entwickelt wurde¹⁶: 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 Ni²⁺-Komplexen^{73, 74}. Die Immobilisierung mit einem Histidin-Anker auf einer Schicht mit terminalen Ni²⁺-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 (siehe dazu Abbildung 3.7.2) ersetzt werden. Dadurch definiert das Protein selbst die Größe des Submembran-Raums. 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 [16] konnte gezeigt werden, dass die Methode mit dem Protein Cytochrom c Oxidase funktioniert. Im Rahmen der Diplomarbeit⁷⁵ konnte am Beispiel der Q-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (bc1-Komplex), 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 Ni²⁺-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 (siehe Abbildung 3.7.1) Es hat sich herausgestellt, dass ein Histidin-Anker mit sechs Histidin-Gruppen eine optimale Bindungskinetik aufweist. Die NTA-

Gruppen sind über eine Thiopropionatgruppe 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 3.7.3 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.

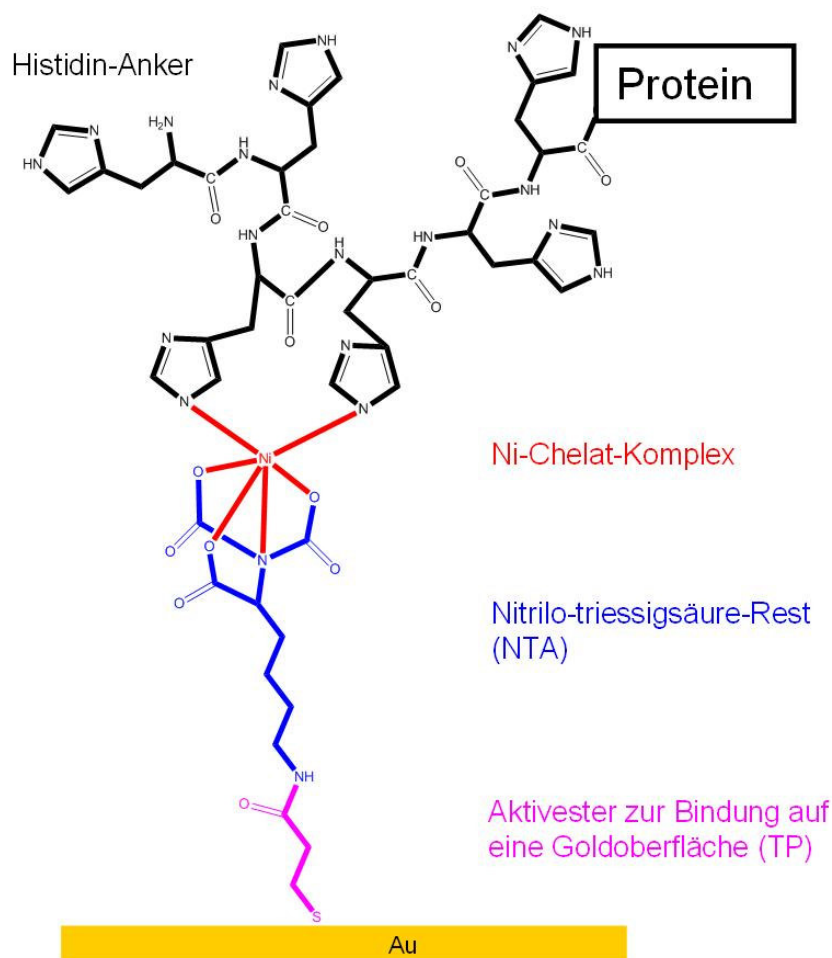


Abb. 3.7.1: Ankerregion zur Immobilisierung der Proteine, welche mit einem Histidin-Anker funktionalisiert wurden.

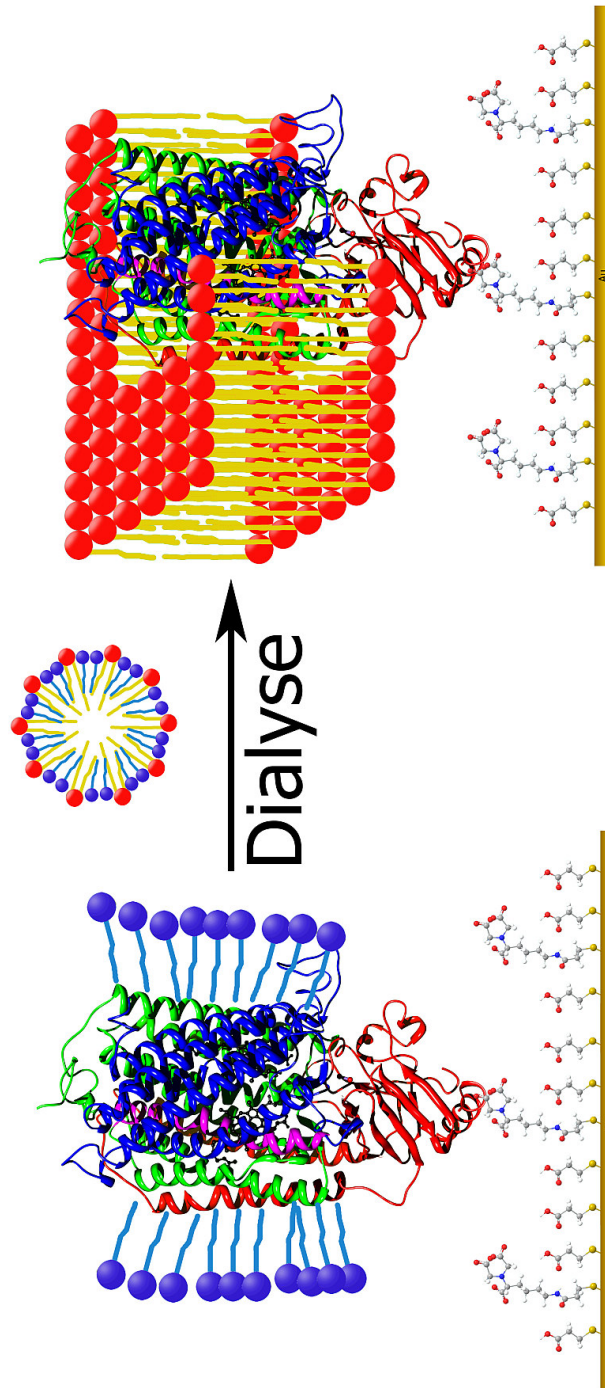


Abb. 3.7.2: Die Dialyse. Links ist das angebundene Protein-Molekül Cytochrom c Oxidase zu sehen, das in seiner hydrophoben von Detergens-Molekülen geschützt wird. Rechts ist das Protein in eine Lipid-Membran rekonstituiert. Die Lipid-Mizelle (Mitte) ist ebenfalls von Detergens-Molekülen eingeschlossen, welche während der Dialyse von Biobeads absorbiert werden.

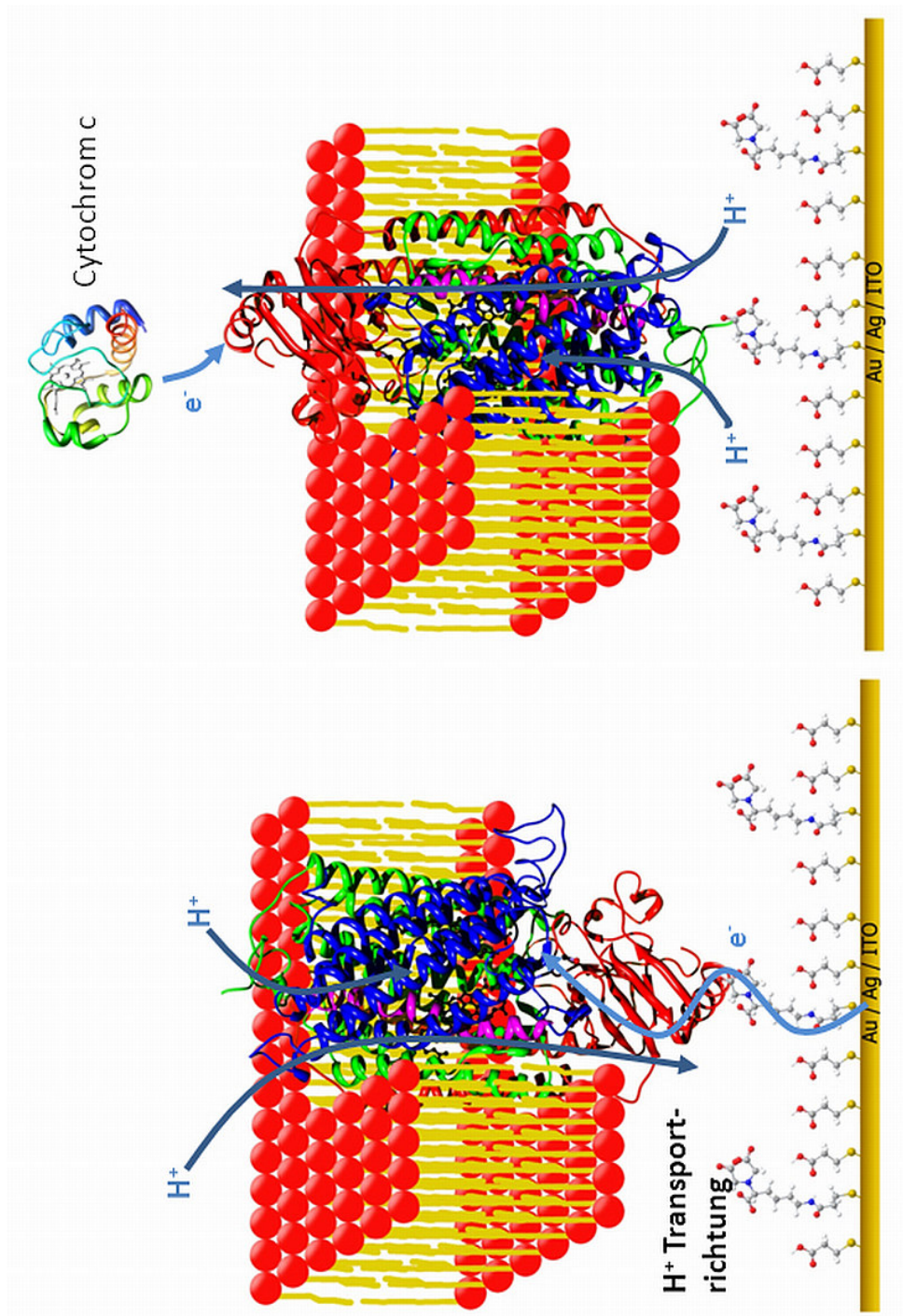


Abb. 3.7.3: Angebundenes Protein nach der Rekonstitution in eine Membran

Kapitel 4

Infrarotspektroskopie

4.1 FTIR-Spektroskopie

Wird Materie mit elektromagnetischer Strahlung beleuchtet, kann sie mit ihr wechselwirken. Die jeweilige Art und der Frequenzbereich der Wechselwirkung sind abhängig vom Aufbau der Materie selbst. Organische Moleküle zeigen im Bereich der infraroten Strahlung ihre charakteristischen Fundamentalschwingungen, während bei höheren Frequenzen die intensitätsschwächeren Oberschwingungen erkennbar sein können. Die IR-Strahlung, die für die IR-Spektroskopie benötigt wird und die für die Strukturaufklärung und Substanzidentifikation in der organischen Analytik von großer Wichtigkeit ist, umfasst den ungefähren Wellenlängenbereich von 1 mm bis 800 nm. Die Spanne des mittleren IR, in dem in der Regel die Spektroskopie molekülspezifischer Schwingungsbanden erfolgt, reicht von 25 μm bis 2,5 μm ($\nu = 400$ bis 4000 cm^{-1}).

Unter bestimmten Voraussetzungen kann ein Molekül elektromagnetische Strahlung absorbieren. Entscheidend ist dabei, dass das Molekül durch die Absorption der Strahlung und die daraus resultierenden, sich insgesamt kompensierenden Schwingungen sämtlicher Atome um ihre Gleichgewichtslagen, das Dipolmoment verändert. Der Schwerpunkt des insgesamt schwingenden Moleküls bleibt erhalten, so dass keine Translations- oder Rotationsbewegung des Moleküls verursacht wird. Ein zweiatomiges Molekül mit Atomen des gleichen Elements kann wegen des fehlenden Dipolmoments durch IR-Strahlung prinzipiell nicht zur Schwingung angeregt werden. Andererseits sind Moleküle aus Atomen verschiedener Elemente aus dem umgekehrten Grund prinzipiell IR-aktiv⁷⁶.

Mehratomige Moleküle können zu ganz unterschiedlichen Schwingungen angeregt werden. Als Beispiel soll die Methylgruppe in einfachen, längerkettigen Alkanen dienen.

In Abbildung 4.1.1 sind die sechs möglichen Schwingungsformen mit den dazugehörigen Wellenzahlen für die Absorption dargestellt. Sie teilen sich auf in zwei Streck- und vier Deformationsschwingungen, welche wiederum teilbar sind in je zwei Schwingungen in der Ebene („in plane“) und zwei, die die Symmetrieebene verlassen („out of plane“), die durch drei Atome H-C-H aufgespannt wird.

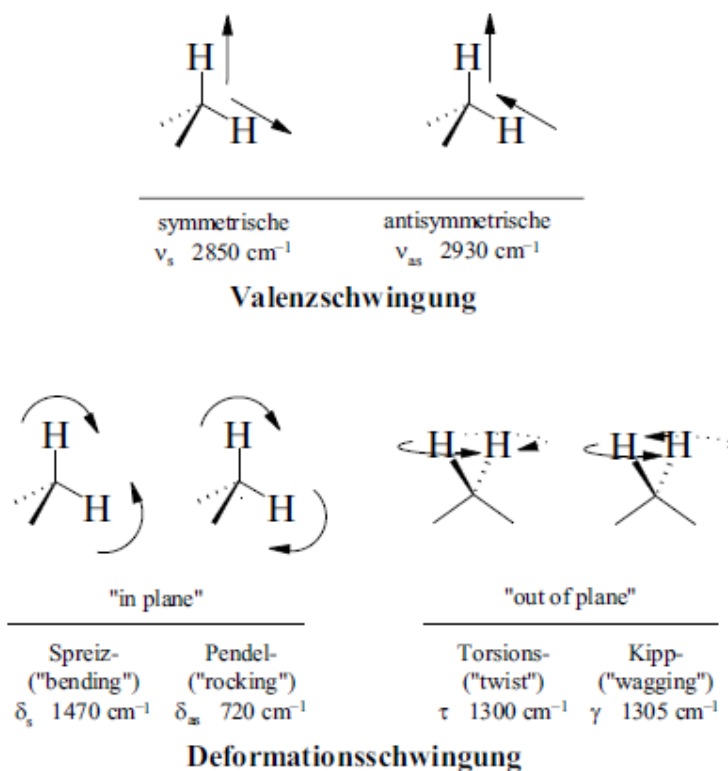


Abb. 4.1.1: Schwingungen der Methylgruppe (CH₂) in einfachen Alkanen ⁷⁷

Jedes Molekül hat eine eigene Absorptionscharakteristik, für die die Molekülstruktur verantwortlich ist. Da sich sämtliche Moleküle, auch die Isomeren, in ihrer Struktur unterscheiden, besitzen sie charakteristische Spektren und lassen sich eindeutig identifizieren. Damit ist die IR-Spektroskopie anderen Methoden wie z.B. der Massenspektroskopie gegenüber im Vorteil.

IR-Spektren wurden lange Zeit mit dispersiven Spektrometern aufgezeichnet, deren zentrales Bauteil ein Gitter- oder Prismen-Monochromator darstellte. Der gesamte Wellenlängenbereich, der die Probe durchstrahlt hat, wurde mit dem Monochromator in die einzelnen Wellenlängen zerlegt und auf den Detektor geleitet. Seit den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts werden die dispersiven Spektrometer durch FTIR-Spektrometer verdrängt.

Das Prinzip der FTIR-Spektrometer beruht im wesentlichen darauf, dass die Messung nicht mehr für jede einzelne Wellenlänge im zu betrachtenden Bereich nacheinander durchgeführt werden muss, sondern mit Hilfe eines Interferometers, z.B. nach Michelson, die Strahlung der Quelle zur simultanen Messung des gesamten Spektralbereichs eingesetzt werden kann. In Abbildung 4.1.2 ist schematisch ein Spektrometer mit Michelson-Interferometer dargestellt.

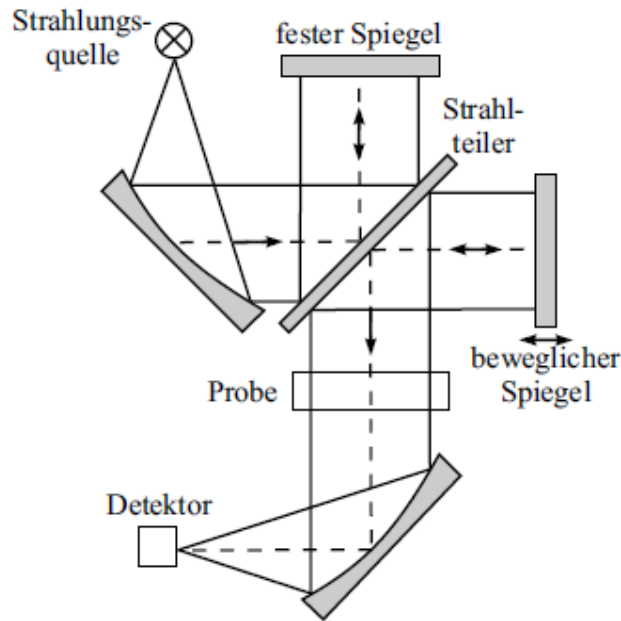


Abb.4.1.2: Schematische Darstellung des Michelson-Interferometers ⁷⁷

Die Strahlung der Quelle wird durch den schräg stehenden, halbdurchlässigen Strahlteiler – im mittleren IR wird meistens KBr benutzt – in zwei Teile zerlegt, die jeweils an Spiegeln reflektiert werden und erneut den Strahlteiler treffen. Einer der beiden Spiegel ist beweglich und sorgt durch die optische Wegverlängerung für eine Phasendifferenz der beiden Teilstrahlen. Die beiden Teilstrahlen interferieren miteinander.

In einem Interferogramm (Abbildung 4.1.3) 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 Position des Interferograms ist eine komplizierte Überlagerung aus interferierenden Wellenlängen.

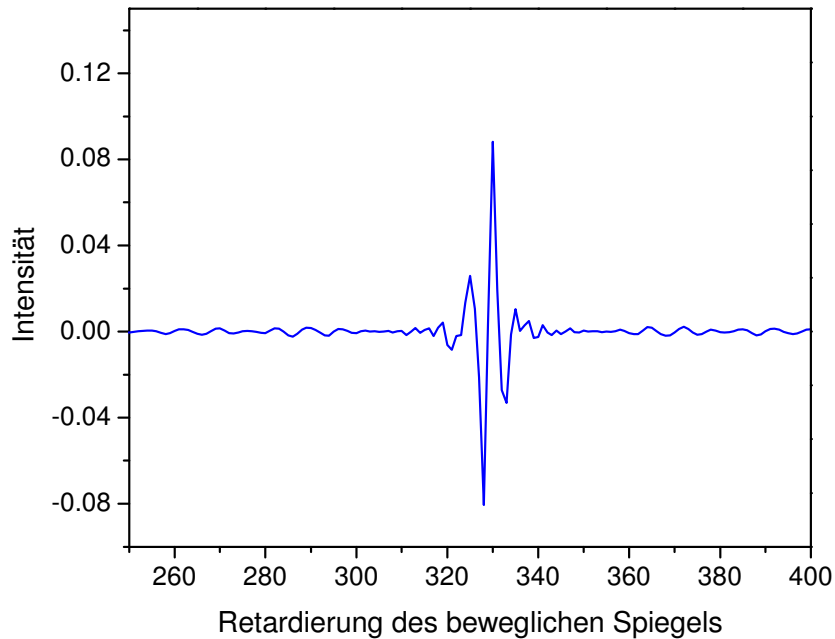


Abb. 4.1.3: Interferogramm eines FTIR-Spektrometers

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 AC-Anteil der Intensität des Interferogramms berechnet sich zu ⁷⁸:

$$I^{AC}(\delta) = \int_0^{+\infty} B(\nu) \cos 2\pi\nu\delta \cdot d\nu \quad (4.1.1)$$

Dabei ist δ die Retardierung und $B(\nu)$ ist definiert über:

$$B(\nu) = \frac{H(\nu) \cdot I(\nu)}{2} \quad (4.1.2)$$

$I(\nu)$ ist die Intensität der Strahlung bei einer bestimmten Wellenzahl und $H(\nu)$ ist ein geräteabhängiger Faktor, in dem die Eigenschaften des Strahlteilers, der Spiegel, des Detektors und der elektronischen Filter zusammengefasst sind. Gleichung 4.1.1 kann mathematisch als Fourierreihe mit reinen Cosinustermen und den Fourierkoeffizienten $B(\nu)$ angesehen werden. Die Fourierkoeffizienten $B(\nu)$ berechnet sich damit zu:

$$B(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} I^{AC}(\delta) \cos 2\pi\nu\delta \cdot d\delta \quad (4.1.3)$$

Gemäß Gleichung 4.1.1 und Gleichung 4.1.3 lassen sich $I^{AC}(\delta)$ und $B(\nu)$ durch Fourier-Transformation ineinander überführen.

Die Absorption durch eine Probe berechnet sich schließlich über

$$A(\nu, t) = -\log \frac{I_S(\nu, t)}{I_R(\nu)} \quad (4.1.4)$$

Wobei $I_S(\nu, t)$ die Intensität des Strahls nach Durchgang durch die Probe (S für sample) ist und $I_R(\nu)$ die Referenz-Intensität ist, also ohne Probe. Allerdings kann der Faktor I_R auch eine Probe sein, bei der sich etwas verändert, wie z.B. in dem Fall der hier vorliegenden Arbeit, die Anbindung einer Proteinschicht, und I_S wird zu einer späteren Zeit aufgenommen. Diese Methode wird Differenz-Spektroskopie genannt und kommt in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz^{5, 77, 79}.

4.2 Infrarotspektroskopie an Proteinen

Ein Infrarotspektrum eines beliebigen Proteins weist Absorptionsbanden auf, welche von den Peptidbindungen stammen. Jede dieser Peptidbindungen steht für eine CONH-Gruppe. Die charakteristischen Banden der CONH-Gruppe werden Amid-Banden genannt.

Insgesamt sind neun Amid-Banden anerkannt. Diese Amid-Banden sind in Tabelle 4.2.1 aufgelistet.

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 IV	725	NH_{ob} , CN_t
	Amid V	625	CO_b (40%), CC_s (30%), CNC_d
	Amid VI	600	CO_{ob} , CN_t
	Amid VII	200	NH_{ob} , CN_t , CO_{ob}

Tabelle 4.2.1

In [80] ist die Entwicklung eines Schwingungs-Kraftfeldes für Polypeptidketten beschrieben. Dabei wurde zunächst ein Kraftfeld des Moleküls N-Methylacetamid berechnet^{81, 82}. 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 ab⁸³. Die berechneten Kraftfelder werden als Basis für die strukturelle Analyse anderer Polypeptid-Moleküle benutzt. Wie bereits erwähnt, wurden in [80] die Schwingungsmoden des Moleküls N-Methylacetamid (siehe Abbildung 4.1.4) mit Hilfe eines Näherungs-Algorithmus berechnet.

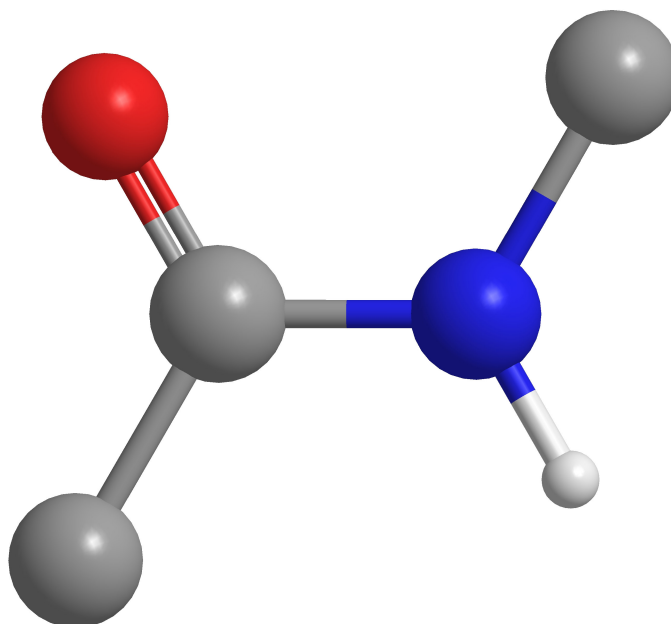


Abb. 4.1.4: Modell der Methylacetamid-Gruppe (Rot: Sauerstoff, Blau: Stickstoff, Grau: Kohlenstoff, Weis: Wasserstoff)

Auf der Basis dieser und weiterer Rechnungen⁸⁴ wurden Frequenzen für die verschiedenen Amid-Banden berechnet. Sie sind in Tabelle 4.2.1 eingetragen. Zu den meisten Banden tragen mehrere der 8 Schwingungs-Moden bei, welche in Tabelle 4.2.2 eingetragen sind^{30, 84, 85}.

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 4.2.2

Die Amid A, Amid I und Amid II Banden werden in der Literatur am häufigsten für die Strukturaufklärung an Proteinen benutzt, dabei ist die Amid I Bande zur Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen in wässrigem Medium, die am häufigsten genutzte Bande ⁸⁶. Die Amid I Bande, die zu ~80 % aus der C=O Streckschwingung besteht, hängt von der Stärke der Wasserstoffbrücken im Peptidrückrat ab. Je stärker die Wasserstoffbrücke, desto mehr Elektronendichte wird von der Carbonylbindung abgezogen und desto kleiner wird die Frequenz ihrer Schwingung. Das Gleiche gilt auch für die Aminogruppen, die als Elektronendonatoren in Wasserstoffbrücken fungieren.

In einem Protein, das gewöhnlich aus mehreren Sekundärstruktur-Elementen mit unterschiedlich starken Wasserstoffbrücken-Bindungen besteht, wird die Amid I Bande in mehrere Komponenten aufgespalten. Daher stellt die Amid I Bande eine komplexe Überlagerung einzelner, überlappender Schwingungsmoden dar.

Die Amid II Bande repräsentiert hauptsächlich die N-H Biegeschwingung (~60 %), sowie die C-N Streckschwingung (~40 %). Analog zur Amid I Bande ist es auch bei der Amid II Bande möglich, diese in verschiedene, überlappende IR-Anteile zu unterteilen, welche von der Sekundärstruktur des Proteins verursacht werden. Die Lage der Amid II Bande in einem IR Spektrum ist sehr stark von dem Deuterierungsgrad der Probe abhängig, so kann man eine Verschiebung von ungefähr 100 cm^{-1} von $\sim 1550\text{ cm}^{-1}$ auf $\sim 1450\text{ cm}^{-1}$ für vollständig deuterierte Proteinproben beobachten. Allerdings muss an dieser Stelle beachtet werden, dass dann die Amid II Bande des vollständig deuterierten Proteins mit der H-O-D Biegeschwingung überlappen kann, was eine genaue Analyse der deuterierten Amid II Bande erschwert. Dennoch kann die Amid II Bande in der nicht deuterierten Form des Proteins ($\sim 1550\text{ cm}^{-1}$) genutzt werden, um Informationen über die Zugänglichkeit des Polypeptid-Gerüsts gegenüber dem verwendeten Lösungsmittel (meist wässrige Lösungen) zu erhalten. So wird die Wahrscheinlichkeit eines Protonenaustauschs der N-H Gruppe durch hydrophobe oder dicht gepackte Strukturen des Polypeptid-Gerüsts deutlich gesenkt ⁸⁶.

Zusätzlich zu den Amid Banden in einem IR Spektrum müssen die Beiträge der Seitenketten der einzelnen Aminosäuren, welche das Protein bilden, zu dem erhaltenen Spektrum berücksichtigt werden. Dieser Bereich in einem IR-Spektrum wird daher Seitenketten-Bereich genannt. Mit Hilfe dieses Bereichs können wichtige Informationen über lokal gebundene Abläufe innerhalb eines Proteins erhalten werden. Solche lokalen Gruppen können z.B. Protonkanäle und die am Protontransport beteiligten Aminosäuren sein. Aus diesem Grund

wurde in der hier vorliegenden Arbeit neben dem Amid I Bereich auch der Seitenkettenbereich der erhaltenen IR Spektren intensiv analysiert.

4.3 Bandenanalyse

Wenn eine IR-Bande eine Überlagerung einzelner Schwingungen darstellt und physikalisch nicht auflösbar ist, werden mathematische Methoden zur Bandenauflösung herangezogen. Dabei gibt es zwei in der IR Spektroskopie gängige Möglichkeiten: Die Fourier-Selbstentfaltung (Fourier-self-deconvolution, FSD) und die Bildung der zweiten Ableitung des Spektrums.

Eine Absorptionsbande lässt sich als Faltung einer Bandenformfunktion mit einer Bandenpositionsfunktion auffassen. Um die Auflösung des Spektrums zu erhöhen, wird durch FSD, die Bandenbreite verringert. Dazu wird das experimentell bestimmte Spektrum mit der Formfunktion entfaltet ⁸⁷, wobei Parameter wie die Halbwertsbreite der einzelnen Banden und der so genannte Verstärkungsfaktor (Verhältnis zwischen der nicht entfalteten und der entfalteten Bande) variiert werden. Die Halbwertsbreite liegt für Proteine im Bereich zwischen ca. 12 und 15 cm^{-1} und der Verstärkungsfaktor liegt zwischen 1,1 und 2. Die maximale Verbesserung der Auflösung wird dabei durch die instrumentelle Auflösung und das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) begrenzt.

Die zweite Ableitung des IR-Spektrums wird oft zur Bestimmung von Bandenmaxima genutzt, mit deren Ergebnissen man dann, kombiniert mit der FSD die Bandensimulation (curve fit) starten kann. Leider liefert die zweite Ableitung des Spektrums aber nur dann verlässliche Informationen bezüglich der Bandenmaxima, wenn die Absorptionsbanden sich nur in einem gewissen Umfang gegenseitig überlappen. Bei Banden, die aus sehr vielen stark überlappenden Absorptionsbanden bestehen, funktioniert diese Methode der zweiten Ableitung nicht immer zuverlässig, auch läuft man Gefahr mit Hilfe der FSD die zu analysierenden Banden zu extrem zu entfalten. Eine solche „Überbehandlung“ des Spektrums würde mehr Banden erzeugen, als wirklich unterhalb der Einhüllenden liegen. Aus diesem Grund wird zur Analyse der Amid I Bande, sowie aller anderen Banden, die sich aus überlagernden Banden zusammensetzen, die Methode der 2D IR-Spektroskopie in der vorliegenden Arbeit angewendet.

4.4 Zwei-Dimensionale Infrarot (2D IR) Spektroskopie

Das Grundkonzept von 2D IR ist im Prinzip mit der 2D-Korrelation, welche in der NMR Spektroskopie genutzt wird, vergleichbar ⁸⁸. Jedoch unterscheiden sich beide 2D-Korrelationen im experimentellen Teil deutlich voneinander, was in [⁸⁹] detailliert beschrieben wird.

Der Hauptbestandteil der in dieser Arbeit gezeigten IR-Spektren, sind Spektren, bei denen sich die IR-Signale mit der Zeit verändern. Diese Änderung des IR-Signals wird durch das Anlegen eines elektrischen Potentials an die Proteinprobe verursacht. Allgemein kann diese Änderung der IR-Absorption eines Systems, gemessen bei der Wellenzahl ν als eine Kombination zweier Absorptionsteile beschrieben werden:

$$\Delta A(\nu, t) = \Delta A(\nu) + \Delta A(\nu, t) \quad (4.4.1)$$

Dabei ist der erste Term $\Delta A(\nu)$ die quasi-statische Komponente, welche die Normal-Absorption wiedergibt. Die Normal-Absorption des betrachteten Systems würde auch gemessen werden, ohne das Anlegen einer äußeren Spannung oder sonstiger Anregung des Systems.

Der zweite Term $\Delta A(\nu, t)$ gibt die Änderung der IR-Absorption in Abhängigkeit von der angelegten, äußeren Anregung des Systems wieder. Dieser IR-Absorptions-Anteil wird nur durch die äußere Anregung des Systems hervorgerufen.

Geht man davon aus, dass es sich bei der äußeren Anregung um eine sinusförmige Anregung der zu untersuchenden Probe handelt, so kann man Gleichung 4.4.1 in Gleichung 4.4.2 überführen:

$$\Delta A(\nu, t) = \Delta A(\nu) \sin[\omega t + \beta(\nu)] \quad (4.4.2)$$

Neben der Amplitude ΔA ist auch der Phasenwinkel β abhängig von der jeweiligen Wellenzahl ν . In [⁸⁹] konnte auch gezeigt werden, dass Gleichung 4.4.2 auch als Summe von zwei orthogonalen Komponenten dargestellt werden kann:

$$\Delta A(\nu, t) = \Delta A'(\nu) \sin \omega t + \Delta A''(\nu) \cos \omega t \quad (4.4.3)$$

Hierbei ist $\Delta A'(\nu)$ der Realteil (in-phase) und $\Delta A''(\nu)$ der Imaginär (quadrature) des aufgenommenen IR-Spektrums. Sowohl $\Delta A'(\nu)$ als auch $\Delta A''(\nu)$ können mit Hilfe von ΔA und β durch die folgenden Gleichungen dargestellt werden:

$$\Delta A'(\nu) = \Delta A(\nu) \cos \beta(\nu) \quad (4.4.4)$$

$$\Delta A''(\nu) = \Delta A(\nu) \sin \beta(\nu) \quad (4.4.5)$$

Das Spektrum des Realteils gibt die Konformationsänderungen der Probe wieder, die durch die Änderungen des Übergangsdipolmoments verursacht werden. Hierbei ändert sich das Übergangsdipolmoment simultan mit der Änderung der Anregung der Probe.

Das Spektrum der Imaginärteils gibt molekulare Änderungen wieder, welche bezüglich ihres Phasenwinkels um $\pi/2$ gegenüber dem Realteil verschoben sind. Solche Änderungen im IR-Spektrum sind dann von der Höhe der verwendeten Anregung abhängig.

Die Gesamtänderung der Übergangsdipolmomente wird durch Gleichung 4.4.6 beschrieben:

$$\begin{aligned} P(\nu) &= \frac{1}{2} [\Delta A'^2(\nu) + \Delta A''^2(\nu)] \\ &= \frac{1}{2} \Delta A^2(\nu) \end{aligned} \quad (4.4.6)$$

Anhand von Abbildung 4.4.1 kann man deutlich erkennen, dass die Spektren von Imaginärteil und Realteil völlig andere Bandenformen besitzen und sich so deutlich voneinander unterscheiden.

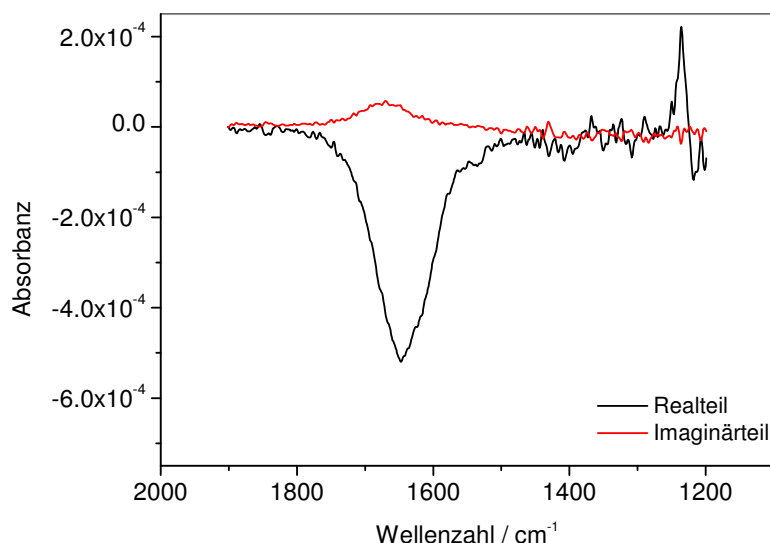


Abb. 4.4.1: Realteil und Imaginärteil eines IR-Spektrums

(Rapid-Scan Messung an Cytochrom c Oxidase mit einer Frequenz von 0,7 Hz gemessen)

Die Tatsache, dass sich Realteil und Imaginärteil so deutlich für jede einzelne IR-Bande voneinander unterscheiden, zeigt dass sich die Ratekonstanten für die Änderungen der einzelnen Übergangsdipolmomente der IR-Banden stark variieren und für jede Bande unterschiedlich sind. Solche wellenzahlabhängigen Variationen der Ratekonstanten werden in der 2D-Spektroskopie benutzt, um stark überlappende Banden in ihre Bestandteile zerlegen zu können. Um solche wellenzahlabhängigen Variationen analysieren zu können, bedient man sich der Methode der Korrelations-Analyse. Gleichung 4.4.7 beschreibt die dafür verwendete Korrelationsfunktion:

$$X(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} \Delta A(\nu_1, t) * \Delta A(\nu_2, t + \tau) dt \quad (4.4.7)$$

Dabei ist $X(\tau)$ die so genannte „dynamic IR cross-correlation function“, $\Delta A(\nu_1, t)$ und $\Delta A(\nu_2, t + \tau)$ repräsentieren ein Paar von IR-Signalen, welche bei zwei verschiedenen Wellenzahlen ν gemessen wurden. Die Korrelationszeit τ wird hierbei als Zeit betrachtet, die zwischen den beiden Messungen bei zwei verschiedenen Wellenzahlen verstrichen ist. T beschreibt in Gleichung 4.4.7 die Korrelations-Periode, für die in [89] $T \rightarrow \infty$ gewählt wurde. Die in 4.4.7 beschriebene Funktion wird dabei als eine Art spektrale Intensität behandelt, welche von der Korrelationszeit τ abhängt. Hält man nun die Korrelationszeit konstant, so ist

Gleichung 4.4.7 nur noch von den beiden Wellenzahlen ν_1 und ν_2 abhängig. Aus dieser Abhängigkeit von zwei Wellenzahlen resultiert die zweidimensionale Natur der hier verwendeten Analyse-Form.

Geht man davon aus, dass sich das Paar IR-Signale sinusförmig ändert und eine gleiche Kreisfrequenz ω besitzt, so lässt sich Gleichung 4.4.7 in Gleichung 4.4.8 umformen:

$$X(\tau) = \Phi(\nu_1, \nu_2) \cos \omega\tau + \Psi(\nu_1, \nu_2) \sin \omega\tau \quad (4.4.8)$$

Dabei sind $\Phi(\nu_1, \nu_2)$ und $\Psi(\nu_1, \nu_2)$ die synchronen bzw. asynchronen Korrelations-Intensitäten, welche durch Gleichungen 4.4.9 und 4.4.10 beschrieben werden:

$$\begin{aligned} \Phi(\nu_1, \nu_2) &= \frac{1}{2} \Delta A(\nu_1) * \Delta A(\nu_2) \cos[\beta(\nu_1) - \beta(\nu_2)] \\ &= \frac{1}{2} [\Delta A'(\nu_1) * \Delta A'(\nu_2) + \Delta A''(\nu_1) * \Delta A''(\nu_2)] \end{aligned} \quad (4.4.9)$$

$$\begin{aligned} \Psi(\nu_1, \nu_2) &= \frac{1}{2} \Delta A(\nu_1) * \Delta A(\nu_2) \sin[\beta(\nu_1) - \beta(\nu_2)] \\ &= \frac{1}{2} [\Delta A''(\nu_1) * \Delta A'(\nu_2) - \Delta A'(\nu_1) * \Delta A''(\nu_2)] \end{aligned} \quad (4.4.10)$$

Diese Terme repräsentieren den Real- und Imaginärteil der „dynamic IR cross-correlation function“ $X(\tau)$.

Die synchrone Korrelations-Intensität $\Phi(\nu_1, \nu_2)$ charakterisiert hierbei Kohärenz zwischen den beiden, gleichzeitig gemessenen Signalen. $\Phi(\nu_1, \nu_2)$ wird hierbei maximal, wenn die gemessenen IR-Signale sich vollständig in Phase befinden, während $\Phi(\nu_1, \nu_2)$ zu einem Minimum wird, wenn sie um den Faktor π phasenverschoben sind. Kleinere Signale innerhalb eines 2D-IR-Spektrums erhält man, wenn die beiden Signale annähernd orthogonal zueinander sind.

Die asynchrone Korrelations-Intensität $\Psi(\nu_1, \nu_2)$ charakterisiert wiederum die Kohärenz zwischen zwei Signalen, welche zu zwei verschiedenen Zeiten gemessen worden sind. Daher wird $\Psi(\nu_1, \nu_2)$ ein Maximum oder zu einem Minimum, wenn die beiden betrachteten Signale orthogonal zueinander sind. Sind die beiden betrachteten Signale nicht direkt in Phase oder

Anti-Phase, so verschwindet $\psi(v_1, v_2)$ an dieser Stelle, und man erhält hierfür keinen Peak im 2D-Spektrum.

Die synchronen sowie asynchronen 2D-Spektren erhält man, wenn man die erwähnten Korrelations-Intensitäten als Funktion zweier unabhängiger Wellenzahlen v_1 und v_2 aufträgt⁸⁹.

4.4.1 Synchrone 2D-Korrelationspektren

Anhand von Gleichung 4.4.9 erkennt man, dass $\Phi(v_1, v_2) = \Phi(v_2, v_1)$ ist. Daher sind symmetrische 2D IR-Spektren symmetrisch bezüglich der Diagonale des Spektrums (siehe dazu Abbildung 4.4.2).

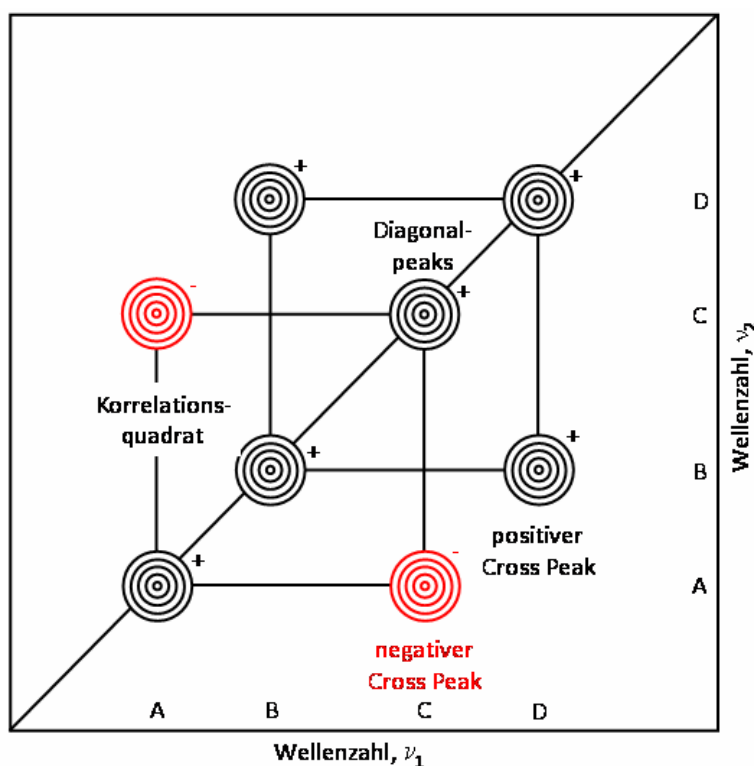


Abb. 4.4.2: Schematisches synchrones 2D-IR-Spektrum

Auf der Diagonalen eines synchronen 2D-Spektrums befinden sich Peaks, welche als „Autopeaks“ oder „Diagonal Peaks“ bezeichnet werden. In Abbildung 4.4.2 sind dies die Peaks A, B, C, D an den Positionen (A,A), (B,B), (C,C) und (D,D).

Es kann anhand von Gleichung 4.4.6 und 4.4.9 gezeigt werden, dass die Korrelationsintensität entlang der Diagonalen eines synchronen 2D-Spektrums auch durch Gleichung 4.4.6 beschrieben werden kann:

$$\begin{aligned}\Phi(\nu_i, \nu_i) &= P(\nu_i) \\ &= \frac{1}{2} [\Delta A'^2(\nu_i) + \Delta A''(\nu_i)]\end{aligned}\quad (4.4.11)$$

Dabei wird $P(\nu_i)$ auch als Energiespektrum in der Literatur bezeichnet ⁸⁹. Dieses Energiespektrum entlang der Diagonalen im 2D-Spektrum spiegelt die Anregbarkeit der untersuchten Spezies durch einen externen Stimulus wieder. Die Anwesenheit von Autopeaks in einem synchronen 2D-Spektrum zeigt, dass sich die Gruppen während der äußeren Anregung umorientieren, welche das IR-Signal hervorrufen. Dabei ist der Grad der jeweiligen Umorientierung einer Gruppe stark von der Umgebung der betrachteten Spezies abhängig.

Die Peaks, welche sich nicht auf der Diagonalen des betrachteten synchronen 2D-Spektrums befinden werden „Cross Peaks“ genannt. Während es bei den Autopeaks keine Vorzeichen gab, können sich die Vorzeichen bei den Cross Peaks ändern.

In Abbildung 4.4.2 befinden sich Cross Peaks mit positivem Vorzeichen bei den Koordinaten (B, D) und (D, B), während sich Cross Peaks mit negativem Vorzeichen an den Stellen (A, C) und (C, A) befinden. Für ein Paar von Cross Peaks an den Koordinaten (ν_i, ν_j) und (ν_j, ν_i) findet man immer zwei korrespondierende Autopeaks an den Positionen (ν_i, ν_i) und (ν_j, ν_j) . Verbindet man diese vier Punkte miteinander, so erhält man ein synchrones Korrelations.Quadrat (siehe dazu Abbildung 4.4.2).

Die Cross Peaks geben Aufschluss über inter- und intramolekulare Wechselwirkungen innerhalb der funktionellen Gruppen, welche das IR-Spektrum verursachen.

Synchrone Cross Peaks entstehen immer dann, wenn zwei Übergangsdipolmomente, welche zu zwei verschiedenen Gruppen gehören sich simultan umorientieren. Solch eine kooperative Umorientierung kann immer dann erwartet werden, wenn starke intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den beiden betrachteten Gruppen bestehen.

Die Cross Peaks in Abbildung 4.4.2 zeigen, dass die IR-Banden bei den Wellenzahlen A und C korrelieren, ebenso wie die Banden B und D miteinander korrelieren. Daher geht aus diesem Spektrum deutlich hervor, dass die submolekularen Gruppen für die jeweiligen IR Banden-Paare stark miteinander wechselwirken, während zwischen den Paaren (A, B), (A, D),

(B, C) sowie (C, D) keine gemeinsame Wechselwirkung und somit Korrelation gefunden werden kann. Diese Banden-Paare reorientieren sich unabhängig voneinander.

Neben den beschriebenen Informationen, die man von den Cross Peaks erhalten kann, geben diese auch Aufschluss über die relative Reorientierung des elektrischen Übergangsdipolmoments. Verläuft die Reorientierung der beiden Übergangsdipolmomente in die gleiche Richtung, beobachtet man einen positiven Cross Peak. Ist die Richtung der Änderung des Einen Übergangsdipolmoments senkrecht zu der des Anderen, beobachtet man einen negativen Cross Peak. Daher kann man anhand eines synchronen 2D-Spektrums Informationen über die räumliche Umorientierung der Übergangsdipolmomente erhalten⁸⁹.

4.4.2 Asynchrone 2D-Korrelationspektren

Die asynchrone Korrelationsintensität $\psi(v_1, v_2)$ repräsentiert die unabhängige oder gegenseitig entkoppelte Reorientierung von Übergangsdipolmomenten während einer äußeren Anregung der Probe. In Abbildung 4.4.3 ist schematisches asynchrones 2D-IR-Spektrum gezeigt, dabei soll angenommen werden, dass Abbildung 4.4.3 das gleiche System beschreibt, welches in Abbildung 4.4.2 beschrieben worden ist.

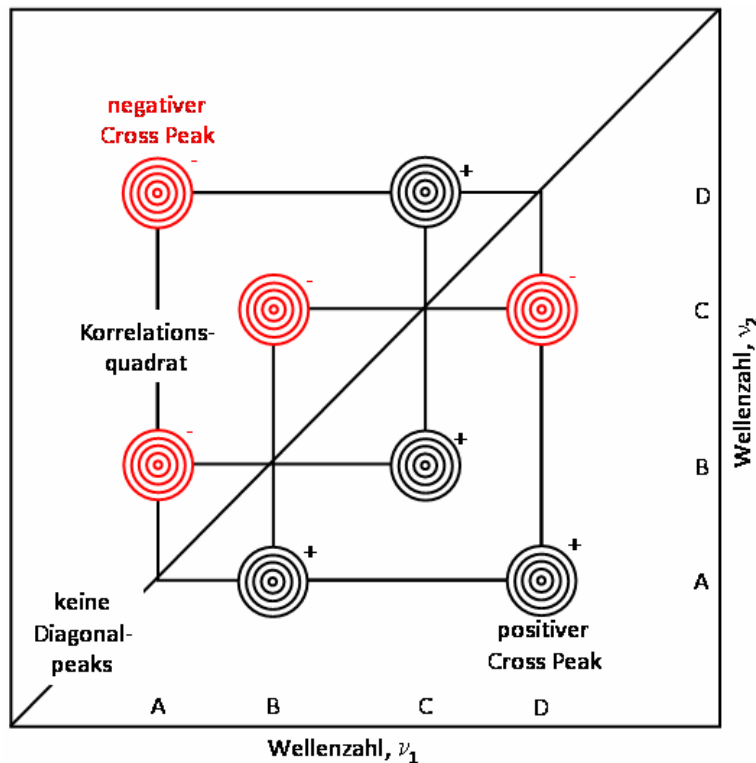


Abb. 4.4.3: Schematisches asynchrones 2D-IR-Spektrum

Anhand von Gleichung 4.4.10 kann gezeigt werden, dass $\psi(v_i, v_j) = \psi(v_j, v_i)$, so dass das asynchrone 2D-Spektrum antisymmetrisch bezüglich der Diagonalen ist. Asynchrone 2D-Spektren besitzen keine „Auto-Peaks“ entlang der Diagonalen. Wie Anhand von Abbildung 4.4.3 zu sehen ist, besteht ein asynchrones 2D-IR-Spektrum ausschließlich aus „Cross-Peaks“, welche über asynchrone Korrelations-Quadrate miteinander verbunden werden können (siehe Abbildung 4.4.3). Dabei besteht ein Korrelations-Quadrat im asynchronen Fall aus zwei Cross-Peaks, welche über zwei, auf der Diagonalen nicht vorhandenen, Punkte miteinander verbunden sind.

Die Cross Peaks im asynchronen 2D weisen in der Regel auf ein Fehlen von starken intramolekularen Wechselwirkungen bzw. chemischen Wechselwirkungen hin. Dies kann damit erklärt werden, weil Cross-Peaks in einem asynchronen 2D-Spektrum nur dann auftreten, wenn sich die Übergangsdipolmomente unabhängig voneinander ändern.

In Abbildung 4.4.3 können die folgenden, von einander entkoppelten, IR-Bandenpaare beobachtet werden: (A, B) (A, D), (B, C), (C, D). Die funktionellen Gruppen, welche zu den erwähnten Banden-Paaren beisteuern Wechselwirken nicht stark miteinander und sind wahrscheinlich räumlich voneinander getrennt. Andererseits zeigen die Paare (A, C), (B, D) keine Cross-Peaks. Dies deutet darauf hin, dass die Reorientierung der Übergangsdipolmomente synchron abläuft, was in Abbildung 4.4.2 durch Anwesenheit von Cross-Peaks im synchronen 2D gezeigt wurde.

Das Auftreten von Cross-Peaks im asynchronen 2D-Spektrum zeigt auch den zeitlichen Verlauf eines Reorientierungs-Prozesses und dessen Zeitpunkt in einer Sequenz von mehreren sich ändernden Übergangsdipolmomenten. Daher kann die Analyse eines asynchronen 2D Spektrums zur Aufklärung von Mechanismen oder Kinetiken von chemischen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen funktionellen Gruppen innerhalb der zu untersuchenden Probe beitragen. Hierfür wurde in [89] ein Satz von Regeln aufgestellt, mit deren Hilfe es möglich ist, zeitliche Sequenzen von Reorientierungs-Prozessen aufzuklären:

- Regel 1:** Wenn ein asynchroner Cross-Peak sich im oberen Teil (bezüglich der Diagonale) des Spektrums befindet ($\nu_1 > \nu_2$) und das Vorzeichen des Peaks positiv ist $\psi(\nu_1, \nu_2) > 0$, dann ändert sich das Dipolmoment von Wellenzahl ν_1 vor dem Übergangsdipolmoment welches mit der Wellenzahl ν_2 assoziiert ist .
- Regel 2:** Wenn ein positiver Cross-Peak in der unteren Hälfte des Spektrums angesiedelt ist ($\nu_1 < \nu_2$), dann ändert sich das Übergangsdipolmoment von Wellenzahl ν_1 vor dem Übergangsdipolmoment welches mit der Wellenzahl ν_2 assoziiert ist .
- Regel 3:** Für negative Cross-Peaks $\psi(\nu_1, \nu_2) < 0$ verhalten sich die zeitlichen Verhältnisse umgekehrt.
- Regel 4:** Falls die korrespondierenden synchronen Korrelations-Intensitäten an den gleichen Koordinaten negativ sind $\Phi(\nu_1, \nu_2) < 0$, so sind die Zeitlichen Verhältnisse von Regel 1, 2 und 3 invers.

Regel 5: Falls die asynchrone Korrelations-Intensität an den Wellenzahlen ν_1 und ν_2 verschwindet $\psi(\nu_1, \nu_2) = 0$ so tritt die Reorientierung der Beiden Übergangsdipolmomente simultan auf.

Regel 6: Falls die synchrone Korrelations-Intensität an den Wellenzahlen ν_1 und ν_2 verschwindet $\Phi(\nu_1, \nu_2) = 0$ so kann die zeitliche Abfolge des Reorientierungs-Prozesses nicht bestimmt werden.

4.5 ATR-FTIR-Spektroskopie

Die ATR-Spektroskopie (Attenuated Total Reflection = Abgeschwächte Totalreflexion) wurde im Jahre 1960 von Harrick und Fahrenfort^{90, 91} eingeführt, mit der die Untersuchung von Oberflächen mit relativ wenig Aufwand möglich wurde. Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie im Gegensatz zu anderen Techniken non invasiv arbeitet, molekulare Informationen einfacher erhalten werden und eine geringere apparative Ausstattung gegenüber konkurrierenden Methoden erfordert.

4.5.1 Totalreflexion

Beim Übergang einer elektromagnetischen Welle von einem optisch dichteren in ein optisch dünneres Medium ($n_1 > n_2$) treten Brechungs- oder Reflexionseffekte auf. Erfolgt der Lichteinfall aus dem optisch dichteren Medium (n_1) mit einem Einfallswinkel θ zur Grenzflächennormalen, so wird der Lichtstrahl im optisch dünneren Medium (n_2) von der Normalen weggebrochen und zwar umso stärker, je größer θ ist. Ab einem bestimmten Grenzwinkel θ_C tritt das Licht streifend, d.h. parallel zur Grenzfläche aus. Wird dieser Grenzwinkel überschritten, ist der Übergang in das dünnere Medium nicht mehr möglich und es kommt zum Phänomen der Totalreflexion. Diesen Grenzwinkel bezeichnet man als kritischen Winkel so dass aus dem Snellius'schen Gesetz folgt⁹²:

$$\sin \Theta = \frac{n_2}{n_1} \quad (4.5.1)$$

Hierbei sind n_1 und n_2 die Brechungsindizes des optisch dichteren bzw. dünneren Mediums. In der ATR-Spektroskopie bezeichnet man das dichtere Medium auch als „Internal Reflection Element“ (IRE). Der Einfallswinkel der Strahlung entspricht dem Winkel, der zwischen der Flächennormalen und der Ausbreitungsrichtung des Strahles gemessen wird. Bei linear polarisierter Strahlung unterscheidet man prinzipiell zwischen zwei Arten, nämlich zwischen p-polarisierter und s-polarisierter Strahlung (von parallel und senkrecht). Im angelsächsischen Sprachraum dagegen, bezeichnet man die beiden Polarisationsarten auch gemäß der Stellung des elektrischen und magnetischen Feldvektors zur Einfallsebene als „Transverse Electric“ (TE = s-Polarisation) bzw. „Transverse Magnetic“ (TM = p-Polarisation). Bei der p-polarisierten Strahlung, verläuft der E-Vektor des einfallenden Strahls parallel zur Einfallsebene, die durch einfallenden und reflektierenden Strahl aufgespannt wird. Der E-Vektor der s-polarisierten Strahlung steht entsprechend senkrecht zu dieser Einfallsebene (siehe Abbildung 4.5.1).

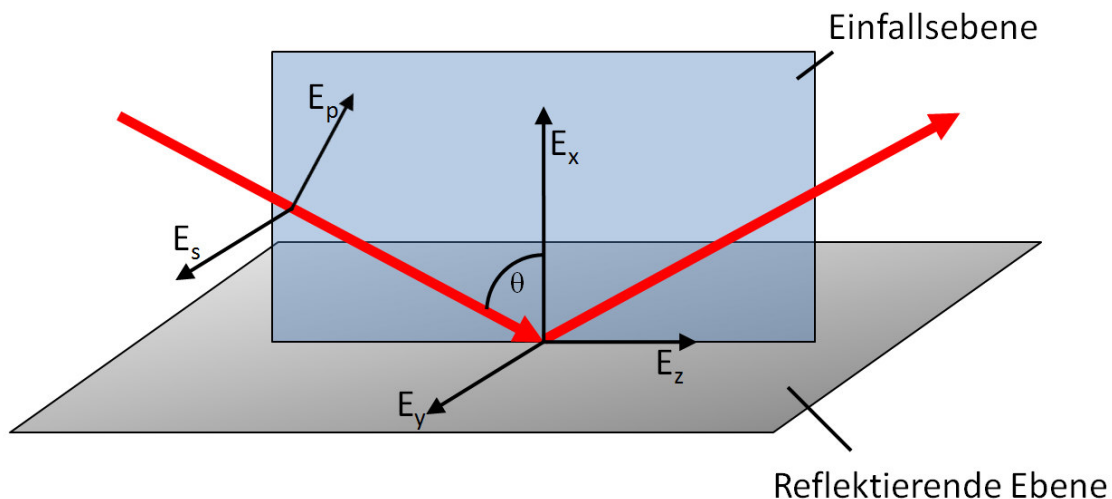


Abb. 4.5.1: Definiertes Koordinatensystem für die Komponenten der elektrischen Feldstärke. E_s ist die Komponente des einfallenden Feldes senkrecht zur Einfallsebene (s-polarisierter Anteil), E_p ist der Anteil parallel zur Einfallsebene (p-Polarisierter Anteil)

4.5.2 Die evaneszente Welle

1890 wurde von Otto Wiener in einem Experiment beobachtet, dass sich bei Lichtwellen, die an einer Spiegeloberfläche reflektiert werden, eine stehende Welle ausbildet, die durch die Interferenz der einfallenden und reflektierten Wellen entsteht⁹³⁻⁹⁵ (siehe Abbildung 4.5.2).

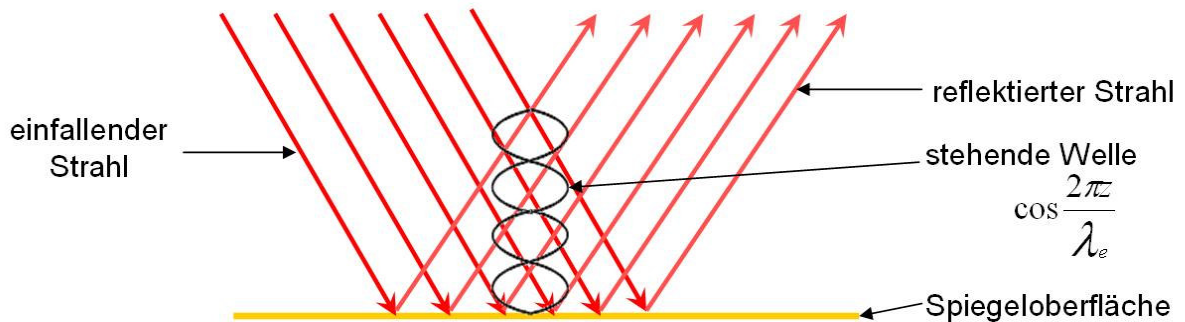


Abb. 4.5.2: Entstehung einer stehenden Welle durch Reflexion an einer Spiegeloberfläche

Während der Strahl an dem Spiegel reflektiert wird, dringt eine stark gedämpfte Welle mit einer Eindringtiefe d_p von weniger als 100 nm in das Metall ein. An der Metalloberfläche muss sich, aufgrund der hohen Leitfähigkeit des Metalls, ein Knoten der interferierenden Wellen befinden. Die Feldstärke der stehenden Welle entspricht in diesem Fall $E=0$ und eine starke Wechselwirkung mit einem Medium an der Oberfläche ist nicht mehr möglich⁹⁶. Findet die Totalreflexion nicht an einer Metalloberfläche statt, ist die Eindringtiefe der Welle größer. Sie beträgt etwa das Vierfache der Wellenlänge der Strahlung⁹⁷.

Die ATR-Spektroskopie beruht nun auf der Existenz dieser elektromagnetischen Welle, die bei Totalreflexion in ein angrenzendes, optisch dünneres Medium eindringt. Sie ist nicht transversal und besitzt elektrische Feldkomponenten in allen drei Raumrichtungen. Die Welle pflanzt sich in diesem Medium in z-Richtung fort und wird in diesem exponentiell gedämpft. Daher bezeichnet man sie auch als abklingende oder evaneszente Welle. Mit der Welle findet kein Energietransport in x-Richtung, also der Ausbreitungsrichtung der Strahlung statt. Das erscheint auch logisch, da sonst die Lichtwelle bei jeder Reflexion an Intensität verlieren würde. In einem solchen Fall könnte man natürlich nicht mehr von einer Totalreflexion sprechen. Sobald sich jedoch die Welle in einem absorbierenden Medium ausbreiten kann,

wird ihr Energie entzogen und damit die reflektierte Welle geschwächt. Es kommt zur abgeschwächten Totalreflexion, dem ATR-Effekt ⁹⁸.

Wie schon eingangs erwähnt, nimmt die Feldamplitude exponentiell mit dem Abstand von der Oberfläche ab und kann über

$$E = E_0 e^{-\gamma z} \quad (4.5.2)$$

mit

$$\gamma = \frac{2\pi \sqrt{(\sin^2 \theta - n_{21}^2)}}{\lambda_1} \quad (4.5.3)$$

$$n_{21} = \frac{n_2}{n_1} ; \quad \lambda_1 = \frac{\lambda}{n_1}$$

berechnet werden, wobei n_1 und n_2 das optisch dichtere bzw. dünnere Medium darstellen (siehe Abb. 4.5.3). E_0 kennzeichnet die Feldstärke in der Grenzfläche, E die Feldstärke im Abstand z von der Grenzfläche.

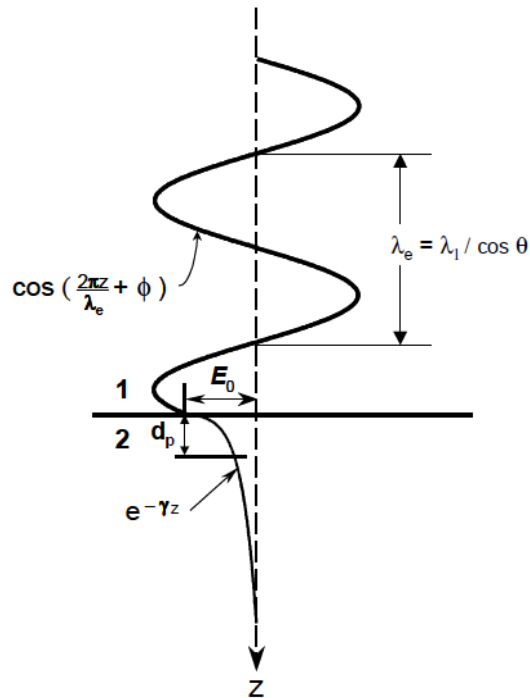


Abb. 4.5.3: Feldamplitude der stehenden Welle bei Totalreflexion und exponentieller Verlauf der evaneszenten Welle im optisch dünneren Medium ⁹⁶

Die evaneszente Welle besitzt die Frequenz der einfallenden Welle, hat aber eine unendliche Wellenlänge ($\lambda_e = \lambda_1 / \cos \theta$). Anders als bei der normalen Lichtbrechung, ist mit dem Eindringen der evaneszenten Welle in das optisch dünnere Medium im zeitlichen Mittel kein Energietransport verbunden. Die evaneszente Welle stellt vielmehr eine Oberflächenwelle dar, die sich parallel zur Einfallsebene fortpflanzt. Das Eindringen in das optisch dünnere Medium erklärt man sich durch Beugung an der Grenzfläche beider Medien ⁹⁷. Dabei gelangt an der Reflexionsstelle etwas Energie in das zweite Medium, die an der Austrittsstelle der Welle wieder in das erste Medium übergeht (Abb. 4.5.4).

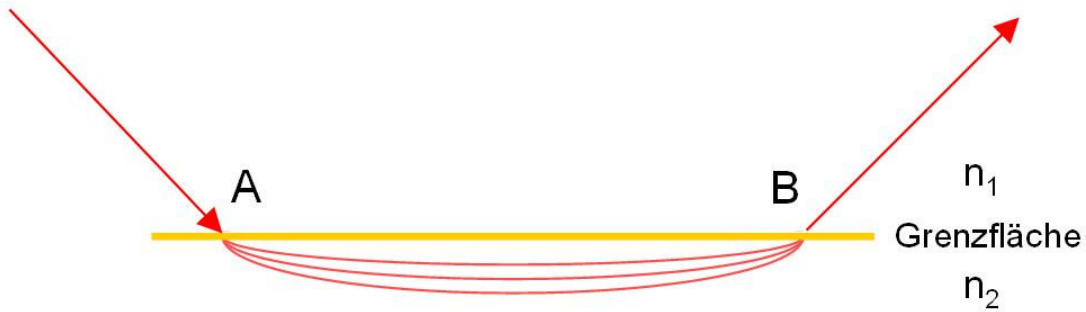


Abb. 4.5.4: Oberflächenwelle und Strahlenversetzung (Goos-Hänchen-Effekt) ⁹⁹

Wie man anhand der Abb. 3.5 auch entnehmen kann, ist mit dem Energietransport entlang der Grenzfläche eine Versetzung des Strahles verbunden. In einem eleganten Experiment wurde dieser Effekt von F. Goos und H. Hänchen nachgewiesen und nach ihnen benannt ⁹⁹. Die Eindringtiefe ist abhängig von der Feldamplitude E_0 an der Grenzfläche (Abb. 4.5.3). Die Feldamplituden dagegen sind abhängig von der Polarisationsrichtung und dem Einfallswinkel der einfallenden Strahlung sowie vom Brechungsindexunterschied der benachbarten Medien (n_1 und n_2).

Die Berechnung der Feldamplituden (E_{\parallel} und E_{\perp}) für parallele bzw. senkrechte Polarisation des einfallenden Lichtes erfolgt anhand der folgenden Gleichungen ⁹⁶⁻⁹⁸:

$$E_{y0} = \frac{2 \cos \theta}{\sqrt{1 - n_{21}^2}} \quad (4.5.4)$$

$$E_{x0} = \frac{2 \cos \theta \sqrt{\sin^2 \theta - n_{21}^2}}{\sqrt{1 - n_{21}^2} \sqrt{(1 + n_{21}^2) \sin^2 \theta - n_{21}^2}} \quad (4.5.5)$$

$$E_{z0} = \frac{2 \sin^2 \theta \cos \theta}{\sqrt{1 - n_{21}^2} \sqrt{(1 + n_{21}^2) \sin^2 \theta - n_{21}^2}} \quad (4.5.6)$$

$$E_{\parallel} = \sqrt{|E_{x0}|^2 + |E_{z0}|^2} \quad (4.5.7)$$

4.5.3 Eindringtiefe der evaneszenten Welle

Wie schon im vorigen Kapitel erwähnt wurde, dringt bei der Totalreflexion eine elektromagnetische Welle in das optisch dünnere Medium ein. Die Intensität dieser Welle nimmt in Abhängigkeit von der Eindringtiefe exponentiell ab. Sie besitzt demnach eine definierte Eindringtiefe, die in etwa die vierfache Wellenlänge der einfallenden Strahlung beträgt. In [95] wurde diese Eindringtiefe („depth of penetration“) als die Tiefe definiert, bei der die Feldamplitude auf den 1/e – ten Teil ihres Wertes in der Grenzfläche abgefallen ist.

Unter Berücksichtigung von Gleichung 4.5.2 erhält man für die Eindringtiefe $z=d_p=1/\gamma$ und somit für d_p :

$$d_p = \frac{\lambda_1}{2\pi \sqrt{\sin^2 \theta - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}} \quad (4.5.7)$$

Diese Eindringtiefe ist jedoch willkürlich, denn die Amplitude des Feldes beträgt bei dieser Tiefe noch ca. 37 % der Intensität an der Grenzfläche⁹⁸. Die tatsächliche Eindringtiefe ist aber größer als d_p . Mirabella⁹⁸ ermittelte für die maximale Eindringtiefe einen Wert von 3 d_p . Den größten Teil der Information erhält man jedoch aus dem Bereich in dem die Intensität der evaneszenten Welle am stärksten ist, d.h. aus den grenzflächennahen Schichten. Wie man der Gleichung Gleichung 4.5.7 entnehmen kann, nimmt d_p mit zunehmendem Einfallswinkel θ und zunehmender Wellenlänge λ bzw. abnehmendem Brechungsindexverhältnis n_2/n_1 ab. In Abb. 4.5.5 ist die Eindringtiefe in Abhängigkeit des eingesetzten Reflexionselementes für einen Einfallswinkel von 60° dargestellt.

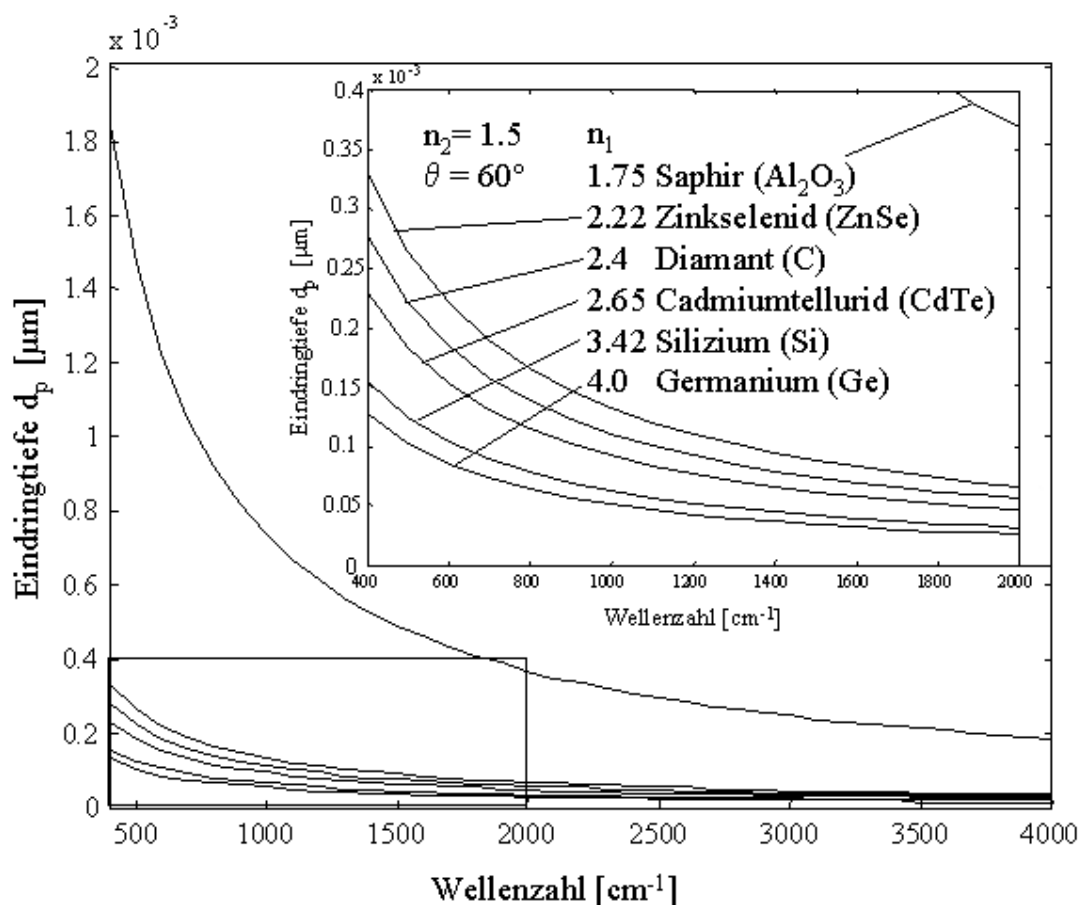


Abb. 4.5.5: Eindringtiefe d_p für verschiedene IRE-Materialien (n_1) für $\theta = 60^\circ$ und $n_2 = 1,5$ ¹⁰⁰

4.5.4 Oberflächenverstärkte ATR-FTIR-Spektroskopie

Die Intensität der Absorption im Infraroten von zu untersuchenden Molekülen wird verstärkt, wenn diese auf einem sehr dünnen Metallfilm, welcher aus vielen kleinen Metall-Inseln besteht, adsorbiert sind. Dieses Phänomen wird als oberflächenverstärkter Infrarot Absorptions Effekt (SEIRA; engl. Surface enhanced infrared absorption) bezeichnet. Dieser Effekt wurde zuerst von Hartstein in den 1980er Jahren entdeckt¹⁰¹. In den letzten 20 Jahren gab es intensive Bemühungen diesen Effekt zu erklären, dabei haben sich zwei mögliche Mechanismen etabliert, welche beide für den SEIRA-Effekt verantwortlich sind und von den meisten Forschern akzeptiert sind. Der erste Mechanismus basiert auf der Wechselwirkung eines einfallenden Photons mit der Metalloberfläche. Durch diese Wechselwirkung wird das elektrische Feld der Oberfläche verstärkt, man spricht hierbei auch von dem elektromagnetischen Mechanismus. Der zweite Mechanismus basiert auf chemischen

Wechselwirkungen zwischen den Molekülen, welche auf die Metalloberfläche aufgebracht worden sind und der Metalloberfläche selbst. Dieser zweite Mechanismus ist auch als chemischer Mechanismus in der Literatur bekannt. Bei der Betrachtung dieser beiden Mechanismen muss allerdings angemerkt werden, dass der Großteil des beobachteten Verstärkungseffekts im infraroten Bereich durch den elektromagnetischen Effekt verursacht wird^{102, 103}.

Die lokale Feldverstärkung kann annähernd durch einen inselförmigen Metallfilm beschrieben werden, wobei die Metallinseln als abgeflachte Ellipsen modelliert werden (siehe Abbildung 4.5.6)^{32, 104}.

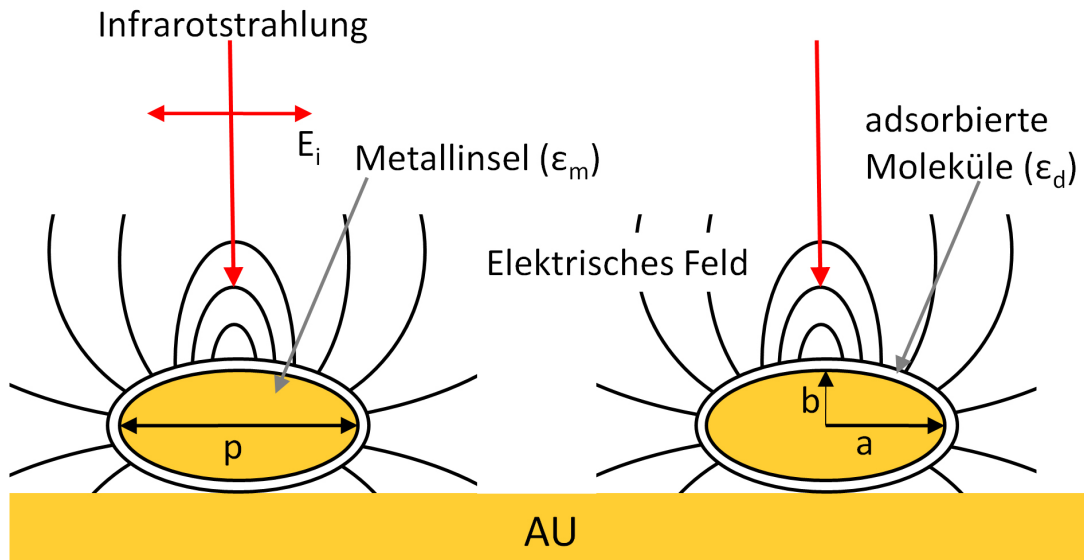


Abb. 4.5.6: Polarisierung (p) der Metallinseln durch einfallende IR-Strahlung sowie das aus der Polarisierung resultierende elektrische Feld. Die Inseln wurden hierbei als Ellipsen mit der Dielektrizitätskonstante ϵ_m dargestellt³². Das adsorbierte Molekül wird als dünne Schicht mit einer Dielektrizitätskonstante ϵ_d angenommen, welche die ellipsenförmige Metallschicht bedeckt. Das Aspektverhältnis der Ellipsen ist definiert als $\eta = a/b$.

Die einfallende IR-Strahlung polarisiert die Metallpartikel und erzeugt hierbei ein Dipolmoment

$$p = \epsilon_0 \alpha E \quad (4.5.8)$$

mit α als Ausdehnung der Metallinseln, ϵ_0 als Dielektrizitätskonstante des Vakuums und E der Amplitude der einfallenden Strahlung^{32, 104}.

Das erzeugte Dipolmoment erzeugt ein elektrisches Feld um die Metallinseln. Dieses elektrische Feld wird durch Gleichung 4.5.8 beschrieben:

$$E_{\text{lokal}} = \frac{2p}{4\pi\epsilon_0 l^3} \quad (4.5.9)$$

Hierbei ist l die Entfernung von dem Zentrum der betrachteten Metallinsel. Das lokale elektrische Feld ist hierbei stärker als das elektrische Feld der einfallenden Strahlung^{32, 104}, daher werden die adsorbierten Moleküle von dem lokalen elektrischen Feld angeregt. Die oszillierenden Dipolfelder innerhalb der adsorbierten Moleküle erzeugen zusätzliche Dipolfelder innerhalb der Metallinseln, wobei die Polarisation der Metallinseln dieselben Frequenzen besitzen wie die molekularen Schwingungen. Gemäß Gleichung 4.5.10 wird hierdurch die Absorption der Moleküle drastisch verstärkt:

$$A \propto E^2 \left| \langle j | \rho | i \rangle \right|^2 \cos^2 \nu \quad (4.5.10)$$

Mit A der Absorption des Moleküls, E dem lokalen elektrischen Feld, $\left| \langle j | \rho | i \rangle \right|$ dem Übergangsdipolmoment, wobei i für den Anfangszustand steht und j den Endzustand beschreibt. ν beschreibt den Winkel zwischen den Vektoren E und ρ ¹⁰².

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 E . Die Komponenten sind in Abbildung 4.5.1 eingezeichnet¹⁰⁵.

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 wird. E_y und E_z aus den Gleichungen 4.5.4 und 4.5.6 verschwinden daher und es können nur Schwingungen senkrecht zur Reflexionsebene detektiert werden.

4.6 Zeitaufgelöste Messungen

Bei modernen FTIR-Spektrometern, die über die entsprechenden Erweiterungen verfügen, gibt es zwei Möglichkeiten der zeitauflösenden Messung. Sowohl mit der Rapid-Scan- als auch mit der Step-Scan-Technik können Datensätze aufgenommen werden, die die Intensität am Detektor in Abhängigkeit der Spiegelstellung und der Zeit aufnehmen und sich in Spektren in Abhängigkeit der Zeit umrechnen lassen.

4.6.1 Rapid-Scan-Mode

Die Rapid-Scan-Technik ist die allgemein verwendete Technik für die Aufzeichnung von FTIR-Spektren. Einen Zyklus der Spiegelbewegung 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 ¹⁰⁶ 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 50 ms.

4.6.2 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 Stabilisieren 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.

Die Qualität dieses Messprinzips ist im Wesentlichen von der genauen Positionierung und Stabilität des beweglichen Spiegels abhängig. in Abbildung 4.6.1 ist die stufen-(step-)förmige Bewegung des beweglichen Spiegels schematisch dargestellt.

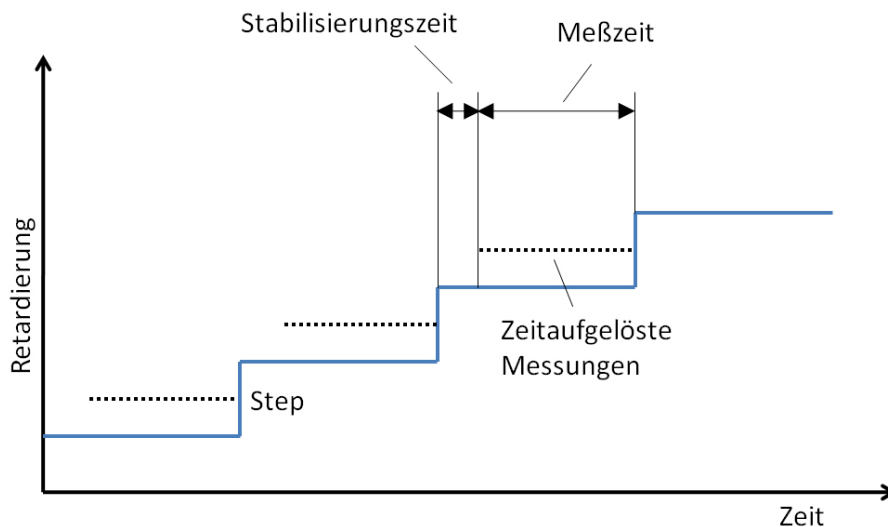


Abb. 4.6.1: Schematische Darstellung der stufenförmigen Bewegung des beweglichen Spiegels. Nach Fortschreiten des Spiegels muss eine Stabilisierungszeit abgewartet werden. Danach wird das Experiment gestartet und die zeitaufgelösten Messpunkte für die entsprechende Interferogrammposition werden aufgezeichnet¹⁰⁶.

4.7 Phasensensitive Detektion bei Modulationsangeregter FT-IR-Spektroskopie

4.7.1 Grundlagen der phasensensitiven Detektion

Die in dieser Arbeit zur Anwendung kommende Technik der phasensensitiven Detektion (PSD) folgt der Methodik, die in [107] 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 angewendet¹⁰⁸. 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, Temperatur, 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 (AC-Anteil) bei, sondern erzeugen einen unmodulierten DC-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 bezeichnet¹⁰⁹. 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 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^{110, 111}. 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 verschieden eingesetztem 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 erforderlich¹¹². 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-PSD¹¹³

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^{114, 115}. An dieser Stelle sei betont, dass die hier beschriebene Methode für Modulations-angeregte FTIR-Spektroskopie allgemein für jede zeitaufgelöste spektroskopische Messung anwendbar ist.

4.7.2 Modulierte Anregung

Die periodische Stimulation und die daraus resultierenden Änderungen in der Absorption sind in Abbildung 4.7.1 veranschaulicht.

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 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.

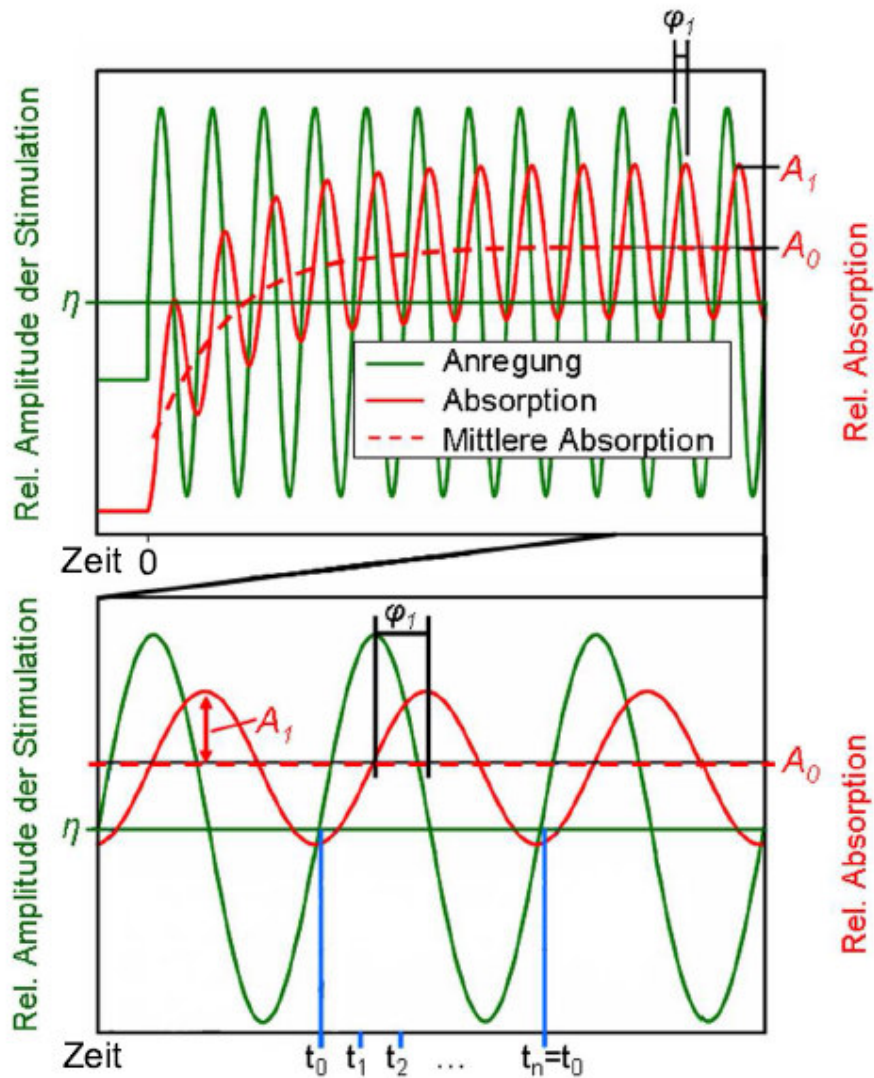


Abb. 4.7.1: Oben: Periodische Stimulation (grün) und daraus resultierende Änderungen in der Konzentration einer absorbierenden Spezies (rot); unten: Ausschnitt. Details sind im Text erläutert³⁰.

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:

$$A(\nu, t) = \sum_i A_i(\nu, t) = \sum_i \varepsilon_i(\nu, t) * c_i(t) * d(t) = -\log \frac{I_S(\nu, t)}{I_R(\nu)} \quad (4.7.1)$$

Dabei sind $I_S(\nu, t)$ die zeitabhängigen Einzelkanalintensitäten der Probe P (sample) und $I_R(\nu)$ ist die Einzelkanalintensität der Referenz R. $\varepsilon(\nu, t)$ ist der Absorptionskoeffizient der jeweiligen Spezies i und d ist die Dicke der Probe. Die Beschreibung der Funktion $A(\nu, t)$ im Frequenz-Raum ist Gegenstand der folgenden Betrachtungen.

4.7.3 Fourieranalyse

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

$$f(t) = a_0 + \sum_{k=1}^{\infty} [a_k \cos(k\omega t) + b_k \sin(k\omega t)] \quad (4.7.2)$$

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:

$$\begin{aligned}a_0 &= \frac{1}{T} * \int_0^T f(t) dt , \\a_k &= \frac{2}{T} * \int_0^T f(t) \cos(k\omega t) dt \quad k = 1, 2, \dots, \\b_k &= \frac{2}{T} * \int_0^T f(t) \sin(k\omega t) dt \quad k = 1, 2, \dots\end{aligned} \quad (4.7.3)$$

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

$$\begin{aligned}a_k &= c_k \sin \varphi_k , \\b_k &= c_k \cos \varphi_k\end{aligned} \quad (4.7.4)$$

Unter Benutzung der trigonometrischen Relation

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

kann die Fourier-Reihe aus Gleichung 4.7.2 als Sinus-Reihe mit zusätzlichem Phasenwinkel φ_k ausgedrückt werden:

$$\begin{aligned}f(t) &= a_0 + \sum_{k=1}^{\infty} [c_k \sin \varphi_k \cos(k\omega t) + c_k \cos \varphi_k \sin(k\omega t)] \\&= a_0 + \sum_{k=1}^{\infty} c_k \sin(k\omega t + \varphi_k)\end{aligned} \quad (4.7.5)$$

Die Amplituden c_k und die Phasenverschiebungen φ_k sind gegeben durch:

$$a_k^2 + b_k^2 = c_k^2 (\sin^2 \varphi_k + \cos^2 \varphi_k) = c_k^2 \quad (4.7.6)$$

mit

$$c_k = \sqrt{a_k^2 + b_k^2} \quad (4.7.7)$$

$$\sin \varphi_k = \frac{a_k}{c_k}, \quad \cos \varphi_k = \frac{b_k}{c_k} \quad (4.7.8)$$

In einem spektroskopischen Experiment besteht die Gesamtabsorption $A(\nu, t)$ (siehe Gleichung 4.7.1) aus einem stationären (DC-) Anteil $A_0(\nu)$ und einem modulierten Anteil $A_m(\nu, t)$. Besteht das System aus N absorbierenden Spezies, so erhält man für die Gesamtabsorption mit Hilfe der Fourierreihe (Gleichung 4.7.2) folgenden Ausdruck:

$$\begin{aligned} A(\nu, t) &= \sum_{i=1}^N A_i(\nu, t) = A_{i,0}(\nu) \\ &= A_0(\nu) + \sum_{i=1}^N \sum_{k=1}^{\infty} \left[A_{i,k}^{90^\circ}(\nu) \cos(k\omega t) + A_{i,k}^{0^\circ}(\nu) \sin(k\omega t) \right] \end{aligned} \quad (4.7.9)$$

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

Nach Gleichung 4.7.3 steht $A_0(\nu)$ für die mittlere Absorption in einer Anregungsperiode (DC-Anteil):

$$A_0(\nu) = \frac{1}{T} * \int_0^T A(\nu, t) dt \quad (4.7.10)$$

$A_k^{0^\circ}(\nu)$ ist der Sinus-Fourierkoeffizient (0° , in Phase) und $A_k^{90^\circ}(\nu)$ der Kosinus-Fourierkoeffizient (90° , außer Phase) der Frequenz $k\omega$. Unter Benutzung von Gleichung 4.7.3 und Gleichung 4.7.4 können $A_k^{0^\circ}(\nu)$ und $A_k^{90^\circ}(\nu)$ folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$A_k^{0^\circ}(\nu) = A_k(\nu) * \cos[\varphi_k(\nu)] = \frac{2}{T} * \int_0^T A(\nu, t) \sin(k\omega t) dt$$
$$A_k^{90^\circ}(\nu) = A_k(\nu) * \sin[\varphi_k(\nu)] = \frac{2}{T} * \int_0^T A(\nu, t) \cos(k\omega t) dt \quad (4.7.11)$$

Nach Gleichung 4.7.5 kann $A(\nu, t)$ auch durch eine Sinusreihe mit den Amplituden $A_k(\nu)$ und den Phasenverschiebungen $\varphi_k(\nu)$ ausgedrückt werden:

$$A(\nu, t) = A_0(\nu) + \sum_{k=1}^{\infty} A_k(\nu) \sin[k\omega t + \varphi_k(\nu)] \quad (4.7.12)$$

4.7.4 Phasensensitive Detektion

Die Methode der phasensensitiven Detektion erlaubt in einem spektroskopischen Modulationsexperiment die Berechnung absoluter gemittelter Absorptionsamplituden $A_k(\nu)$ und gemittelter Phasendifferenzen $\varphi_k(\nu)$. 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 $A_k(\nu)$ für eine bestimmte Frequenz $k\omega$ aus den Absorbanzen $A_{ik}(\nu)$ aller Spezies X_i , die an der Wellenzahl ν absorbieren, zusammengesetzt ist. Darüber hinaus hat jede dieser Komponenten $A_{ik}(\nu)$ ihre eigene Phasenverschiebung $\varphi_{ik}(\nu)$.

Das analytische Vorgehen bei der PSD besteht in einer Multiplikation von $A(\nu, t)$ mit einer periodischen Funktion, z.B. $\sin(k\omega t + \Phi_k^{PSD})$, gefolgt von einer normalisierten Integration über eine Periode T . So wird als neuer Parameter der kontrollierbare Phasenwinkel Φ_{PSD} eingeführt (siehe Gleichung 4.7.13):

$$A_k^{\phi_k^{PSD}}(\nu) = \frac{2}{T} * \int_0^T A(\nu, t) \sin(k\omega t + \phi_k^{PSD}) dt \quad (4.7.13)$$

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

$A_k^{\phi_k^{PSD}}(\nu)$ 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 $A_k^{\phi_k^{PSD}}(\nu)$ der In-Phase bzw. Ausser-Phase-Komponente in Gleichung 4.7.11.

$A_k^{\phi_k^{PSD}}(\nu)$ kann als Linearkombination aus $A_k^{0^\circ}(\nu)$ und $A_k^{90^\circ}(\nu)$ ausgedrückt werden, wenn man Gleichung 4.7.13 mit Hilfe der trigonometrischen Relation

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

folgendermaßen umformt:

$$\begin{aligned} A_k^{\phi_k^{PSD}}(\nu) &= \frac{2}{T} * \int_0^T A(\nu, t) \sin(k\omega t + \phi_k^{PSD}) dt \\ &= \frac{2}{T} * \int_0^T A(\nu, t) [\sin(k\omega t) \cos(\phi_k^{PSD}) + \cos(k\omega t) \sin(\phi_k^{PSD})] dt \\ &= \frac{2}{T} * \int_0^T A(\nu, t) \sin(k\omega t) dt * \cos(\phi_k^{PSD}) \\ &\quad + \frac{2}{T} * \int_0^T A(\nu, t) \cos(k\omega t) dt * \sin(\phi_k^{PSD}) \\ &= A_k^{0^\circ}(\nu) \cos(\phi_k^{PSD}) + A_k^{90^\circ}(\nu) \sin(\phi_k^{PSD}) \end{aligned} \tag{4.7.14}$$

Einsetzen von 4.7.11 in 4.7.14 und Benutzung der trigonometrischen Relation

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

liefert:

$$\begin{aligned} A_k^{\phi_k^{PSD}}(\nu) &= A_k(\nu) \cos(\varphi_k) \cos(\phi_k^{PSD}) + A_k(\nu) \sin(\varphi_k) \sin(\phi_k^{PSD}) \\ &= A_k(\nu) \cos(\varphi_k - \phi_k^{PSD}) \end{aligned} \tag{4.7.15}$$

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. $\varphi_k(\nu) = \Phi_k^{PSD}$, so liefert die Kosinus-Funktion in Gleichung 4.7.15 den Betrag eins, die Amplitude $A_k^{\Phi_k^{PSD}}$ wird maximal und ist dann gleich der unbekanntenen Amplitude $A_k(\nu)$. Eine Maximierung von $A_k^{\Phi_k^{PSD}}$ für eine bestimmte Wellenzahl durch Variation von Φ_k^{PSD} liefert demnach sowohl die Modulationsamplitude $A_k(\nu)$ als auch die Phasenverzögerung $\varphi_k(\nu)$ für die Frequenz ν .

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

$$A_k^{\varphi_k(\nu) \pm 90^\circ}(\nu) = 0 \quad (4.7.16)$$

Das Ziel der phasensensitiven Detektion in der Modulationsspektroskopie ist demnach die Ermittlung der phasenaufgelösten Absorptionsspektren $A_k^{\Phi_k^{PSD}}(\nu)$ aus der zeitabhängigen Gesamtabsorption $A(\nu, t)$ mit Hilfe des Algorithmus, welcher durch Gleichung 4.7.13 beschrieben wird³⁰.

4.7.5 PSD zeitaufgelöster Spektren

Sowohl die PSD der Intensität $I(\nu, t)$, 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 erst nach der Aufnahme des gesamten Datensatzes zum Einsatz, wodurch keine wertvolle Messzeit verloren geht ¹¹³. Alle Spektren werden als m-dimensionale Vektoren behandelt, welche die Intensitäten bzw. die Absorptionen bei m verschiedenen Wellenzahlen ν_i zu einer bestimmten Zeit t enthalten:

$$\vec{I}(t) = \begin{pmatrix} I(\nu_1, t) \\ I(\nu_2, t) \\ \dots\dots\dots \\ I(\nu_{m-1}, t) \\ I(\nu_m, t) \end{pmatrix}, \quad \vec{A}(t) = \begin{pmatrix} A(\nu_1, t) \\ A(\nu_2, t) \\ \dots\dots\dots \\ A(\nu_{m-1}, t) \\ A(\nu_m, t) \end{pmatrix} \quad (4.7.17)$$

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 4.7.1):

$$\vec{I}_S(t_i) = \vec{I}_S(t = i * T / n) \quad i = 0, \dots, n-1 \quad (4.7.18)$$

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 $I_R(\nu)$ in Gleichung 4.7.1 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 $I'_R(\nu) = 1$ benutzt wird. Das entsprechende Absorptionsspektrum, die Vektorelemente und das Pseudo-Referenzspektrum sind mit einem Strich gekennzeichnet.

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

$$I'_R(\nu) = 1 \tag{4.7.19}$$

Die Fourierkomponenten von $A'(t, \nu)$ werden mit dem PSD-Algorithmus aus Gleichung 4.7.3 berechnet, wobei die Simpson-Regel für numerische Integration (Gleichung 4.7.20) benutzt wird:

$$\int_0^T y(t) dt \approx \frac{\Delta t}{3} (y_0 + 4y_1 + 2y_2 + 4y_3 + \dots + 2y_{n-2} + 4y_{n-1} + y_n)$$

$$= \frac{\Delta t}{3} \sum_{i=0}^n s_i y_i \tag{4.7.20}$$

s_i sind hierbei die Simpson-Koeffizienten, n muss gerade sein. Gemäß Gleichung 4.7.20 und Gleichung 4.7.10 lässt sich der DC-Anteil von \vec{A}_0 ausrechnen:

$$\begin{aligned}
 A'_0(\nu) &= \frac{1}{T} * \int_0^T A'(\nu, t) dt \\
 &= \frac{\Delta t}{3n\Delta t} \sum_{i=0}^n s_i A'(\nu, t_i) = \frac{1}{3n} \sum_{i=0}^n s_i A'(\nu, t_i)
 \end{aligned} \tag{4.7.21}$$

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

Man erhält:

$$\begin{aligned}
 A'_k{}^{0^\circ}(\nu) &= \frac{2}{T} * \int_0^T A'(\nu, t) \sin(k\omega t) dt \\
 &= \frac{2\Delta t}{3n\Delta t} \sum_{i=0}^n s_i A'(\nu, t_i) \sin\left(k \frac{2\pi i T}{T n}\right) \\
 &= \frac{2}{3n} \sum_{i=0}^n s_i A'(\nu, t_i) \sin\left(2\pi \frac{ki}{n}\right)
 \end{aligned} \tag{4.7.22}$$

$$\begin{aligned}
 A'_k{}^{90^\circ}(\nu) &= \frac{2}{T} * \int_0^T A'(\nu, t) \cos(k\omega t) dt \\
 &= \frac{2}{3n} \sum_{i=0}^n s_i A'(\nu, t_i) \cos\left(2\pi \frac{ki}{n}\right)
 \end{aligned} \tag{4.7.23}$$

Diese Berechnungen zur Absorption wurden alle mit einer konstanten Referenz $\bar{I}_r = 1$ durchgeführt. Es wird anschließend gezeigt, dass nur der stationäre Anteil des PSD-

Ergebnisses $A_0(\nu)$ von der Wahl des Referenzspektrums abhängt, während die Modulationsspektren der Fundamentalfrequenz und der Obertöne davon unbeeinflusst bleiben. $I_R(\nu)$ sei ein beliebiges, zeitunabhängiges Referenzspektrum. Das mittlere Absorptionsspektrum \overline{A}_0 in Bezug auf dieses Referenzspektrum erhält man analog zu Gleichung 4.7.19:

$$\begin{aligned}
 A_0(\nu) &= -\log \frac{I_{S,0}(\nu)}{I_R(\nu)} \\
 &= -\log \frac{I_{S,0}(\nu)I'_R(\nu)}{I'_R(\nu)I_R(\nu)} = A'_0(\nu) - \log \frac{1}{I_R(\nu)} \\
 &= A'_0(\nu) + \log I_R(\nu)
 \end{aligned} \tag{4.7.24}$$

Wie anschließend mit Gleichung 4.7.25 für $\overline{A}_k^{0^\circ}(\nu)$ gezeigt wird, werden die Modulationsspektren $\overline{A}_k^{0^\circ}(\nu)$ und $\overline{A}_k^{90^\circ}(\nu)$, die durch PSD ermittelt werden (d.h. Berechnung der Fourierkoeffizienten mit $k>0$) nicht von der Wahl von $I_R(\nu)$ beeinflusst, denn der Term $\log I_R(\nu) \int_0^T \sin(k\omega t) dt$ verschwindet für alle k .

$$\begin{aligned}
 A_k^{0^\circ}(\nu) &= \frac{2}{T} \int_0^T A(\nu, t) \sin(k\omega t) dt \\
 &= \frac{2}{T} \int_0^T [A'(\nu, t) + \log I_R(\nu)] \sin(k\omega t) dt \\
 &= \frac{2}{T} \int_0^T A'(\nu, t) \sin(k\omega t) dt \\
 &= A_k'^{0^\circ}(\nu)
 \end{aligned} \tag{4.7.25}$$

Aus Gleichung 4.7.25 folgt, dass $\overrightarrow{A}_k^{0^\circ} = \overrightarrow{A}_k^{90^\circ}$ und $\overrightarrow{A}_k^{90^\circ} = \overrightarrow{A}_k^{0^\circ}$ gilt. Die Gleichungen 4.7.22 und 4.7.23 liefern demnach die korrekten Modulationsspektren $\overrightarrow{A}_k^{0^\circ}$ und $\overrightarrow{A}_k^{90^\circ}$.

Modulationsspektren $\overrightarrow{A}_k^{\phi_k^{PSD}}$ können für jeden beliebigen Phasenwinkel Φ_k^{PSD} berechnet werden. Dazu muss Gleichung 4.7.13 gemäß Gleichung 4.7.20 numerisch integriert werden:

$$\begin{aligned}\overrightarrow{A}_k^{\phi_k^{PSD}}(\nu) &= \frac{2}{T} * \int_0^T A(\nu, t) \sin(k\omega t + \phi_k^{PSD}) dt \\ &= \frac{2}{3n} \sum_{i=0}^n s_i A(\nu, t_i) \sin\left(2\pi \frac{ki}{n} + \phi_k^{PSD}\right)\end{aligned}\quad (4.7.26)$$

Zwischen $\overrightarrow{A}_k^{\phi_k^{PSD}}(\nu)$ und den orthogonalen Modulationsspektren $\overrightarrow{A}_k^{0^\circ}(\nu)$ und $\overrightarrow{A}_k^{90^\circ}(\nu)$ besteht der Zusammenhang aus Gleichung 4.7.14:

$$\overrightarrow{A}_k^{\phi_k^{PSD}}(\nu) = A_k^{0^\circ}(\nu) \cos(\phi_k^{PSD}) + A_k^{90^\circ}(\nu) \sin(\phi_k^{PSD}) \quad (4.7.27)$$

Die Phasenverschiebung für eine bestimmte Frequenz berechnet sich über

$$\varphi(\nu) = \arctan \frac{A_k^{90^\circ}(\nu)}{A_k^{0^\circ}(\nu)}, \quad A_k^{0^\circ}(\nu) > 0 \quad (4.7.28)$$

$$\varphi(\nu) = \arctan \frac{A_k^{90^\circ}(\nu)}{A_k^{0^\circ}(\nu)} + 180^\circ, \quad A_k^{0^\circ}(\nu) < 0 \quad (4.7.29)$$

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. Baurecht (Universität Wien) verwendet wird^{30, 106, 113}.

Kapitel 5

Elektrochemie

5.1 Zyklische Voltammetrie

Die Zyklische Voltammetrie dient im Allgemeinen zur Gewinnung von Informationen über Elektrodenprozesse. Zyklovoltammogramme geben Auskunft über die Thermodynamik von Redoxprozessen, die Kinetik heterogener Elektronentransferreaktionen sowie die Zusammenhänge gekoppelter chemischer Reaktionen. Zyklische Voltammogramme von Systemen sind gekennzeichnet durch ihre charakteristische Form und durch definierte Peakpositionen sowie Peakintensitäten.

Zur Messung eines Zyklischen Voltammogramms wird eine stationäre Arbeitselektrode, die in einen ruhenden Elektrolyten eingetaucht ist verwendet. An die Arbeitselektrode wird ein sich zeitlich linear änderndes Potential $E(t)$ angelegt, welches nach Erreichen des Umkehrpotentials E_1 dann linear zum Umkehrpotential E_2 läuft und schließlich wieder beim Ausgangspotential ankommt, was in Abbildung 5.1.1 gezeigt wird.

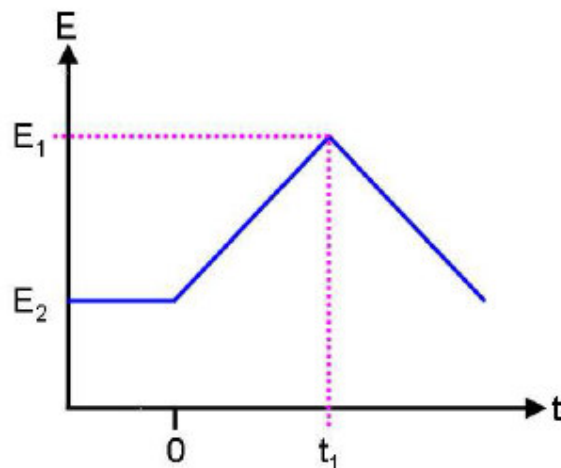


Abb.5.1.1: Dreiecksförmiger Potentialverlauf eines Zyklischen Voltammogramms ³⁰.

In Abbildung 5.1.2 ist ein Zyklisches Voltammogramm mit charakteristischer Kurvenform dargestellt. Es wird die Stromstärke des durchlaufenen Potentials aufgezeichnet. Die Potentialvorschubgeschwindigkeit $v = dE/dt$ betragen in dieser Arbeit, wenn nicht anders angegeben 0,05 V/s.

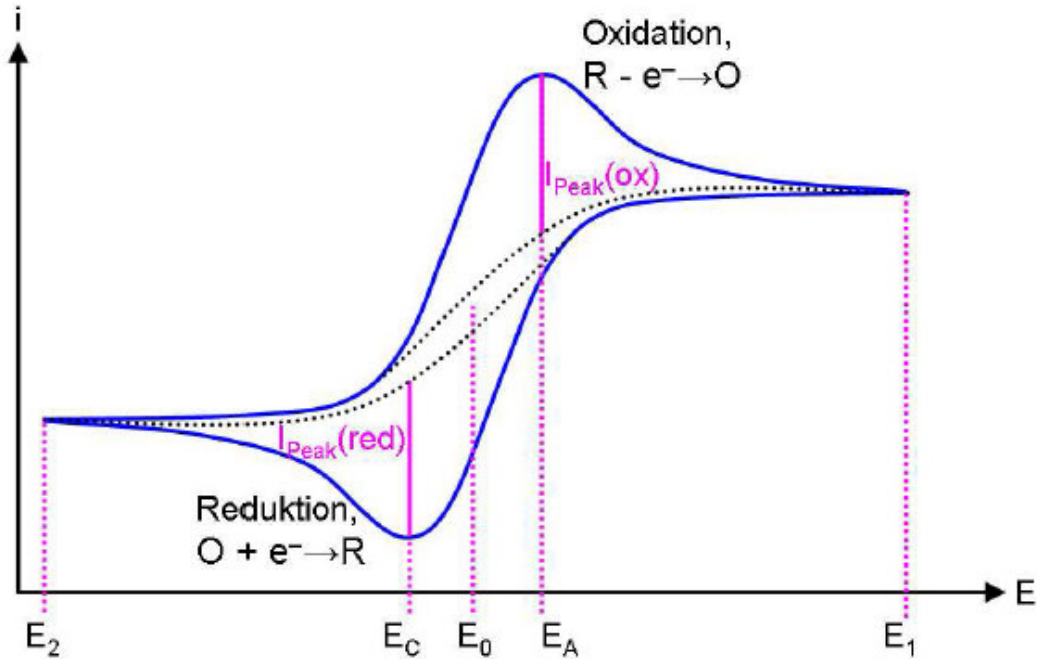


Abb.5.1.2: Zyklisches Voltammogramm mit charakteristischer Kurvenform für einen reversiblen Ladungstransfer. E_A : anodischer Peak, E_C : kathodischer Peak, E_0 : Redoxpotential, E_1 und E_2 : Umkehrpotentiale ³⁰.

5.2 Zyklische Voltammetrie gelöster Redox-Spezies

Es gibt zwei verschiedene Arten von Strömen, die in Elektrodenvorgängen auftreten können:

Nicht-Faradaysche Ströme: Diese Ströme sind elektrischer Natur und werden nicht durch elektrochemische Reaktionen hervorgerufen. Sie werden auch als kapazitive Ströme bezeichnet und erfolgen aus der Reorganisation von Ionen im Elektrolyt nahe der Elektrodengrenzfläche. Für den Potentialverlauf $E = E_{Start} + v_{Scan} * t$ bei konstanter Grenzschieichtkapazität und unter der Annahme, dass nur ein einziger Lösungsmittelwiderstand R_S vorliegt, erhält man für den Strom:

$$I_C = \frac{E_{Start}}{R_S} * e^{-t * \frac{C}{R_S}} + v * C * \left(1 - e^{-t * \frac{C}{R_S}} \right) \quad (5.2.1)$$

Die Gleichung sagt aus, dass der kapazitive Strom mit zunehmender Scan Rate und mit zunehmender Grenzschichtkapazität zunimmt. Die Richtung, in die das Potential läuft entscheidet über das Vorzeichen des zweiten Summanden.

Faradaysche Ströme: Sie werden hervorgerufen durch den heterogenen Ladungstransfer zwischen Elektrode und Redoxspezies, die im Elektrolyten vorliegt. Die Reaktion ist dabei immer mit einem chemischen Stoffumsatz verbunden. Die Zusammenhänge sind gegeben durch die Faradayschen Gesetze ¹¹⁶.

Die einfache Faradaysche Elektrodenreaktion besteht im heterogenen Ladungstransfer von einer elektroaktiven Spezies A zur Elektrode oder umgekehrt. In Abhängigkeit vom Elektrodenpotential 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:

$$j_A(0,t) = \frac{i}{nFA} = c_{ox}(o,t) * k^0 * e^{-\alpha \frac{nF}{RT}(E-E_0)} - c_{Red}(o,t) * k^0 * e^{(1-\alpha) \frac{nF}{RT}(E-E_0)} \quad (5.2.3)$$

Dabei ist k^0 die Standardgeschwindigkeitskonstante des heterogenen Durchtritts, α der Durchtrittsfaktor, E_0 das Standardpotential, A die Elektrodenfläche, F die Faradaykonstante und c_{Ox} und c_{Red} sind die Oberflächenkonzentrationen der jeweiligen Redoxpartner. Das Standardpotential E_0 charakterisiert dabei einen Zustand im thermodynamischen

Gleichgewicht, bei dem die Oberflächenkonzentration von reduzierter und oxidierter Spezies gleich groß sind. Die potenzialabhängigen Oberflächenkonzentrationen $c_0(0,t)$ und $c_R(0,t)$ führen aufgrund des Konzentrationsunterschiedes zur übrigen Lösung zu einem diffusionskontrollierten Massentransport. Die Entwicklung der Konzentrationsverteilung in der Diffusionsschicht ist gegeben durch das zweite Ficksche Gesetz:

$$\frac{\delta c_{Ox}}{\delta t} = D_{Ox} \frac{\delta^2 c_{Ox}}{\delta x^2} \quad (5.2.4)$$

$$\frac{\delta c_{Red}}{\delta t} = D_{Red} \frac{\delta^2 c_{Red}}{\delta x^2} \quad (5.2.5)$$

Der Konzentrationsgradient an der Elektrodenoberfläche ist dem Ladungsfluss direkt proportional:

$$\begin{aligned} j_A(0,t) &= -D_{Ox} \left(\frac{\delta c_{Ox}}{\delta x} \right)_{x=0} \\ &= D_{Red} \left(\frac{\delta c_{Red}}{\delta x} \right)_{x=0} \end{aligned} \quad (5.2.6)$$

Da sich der an der Arbeitselektrode messbare Strom zu einem Anteil aus dem heterogenen Ladungstransfer (Gleichung 5.2.3) und zum Anderen aus dem diffusionskontrollierten Massentransport (Gleichung 5.2.6) zusammensetzt, nennt man diesen Vorgang den Quasireversiblen Fall des Ladungstransfers.

Für den Fall, dass die Geschwindigkeit des heterogenen Ladungstransfers so groß ist, dass sich an der Phasengrenze ein dynamisches Gleichgewicht einstellt, spricht man von dem Reversiblen Fall. Dabei ist $k^0 > 10^{-1}$ cm/s. Für diesen Sonderfall vereinfacht sich die Butler-Volmer-Gleichung zur Nernst-Gleichung:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} * \ln \left(\frac{c_{Ox}}{c_{Red}} \right) \quad (5.2.7)$$

Somit hängen die Oberflächenkonzentrationen c_{Ox} und c_{Red} nur noch vom Elektrodenpotential ab und nicht mehr von heterogenen kinetischen Effekten. Der Strom an der Elektrodenoberfläche wird ausschließlich durch den Massentransport, dem langsamsten Vorgang, kontrolliert. Damit ist der Strom in diesem Fall diffusionskontrolliert. In Abbildung 5.2.2 ist ein reversibler Redoxvorgang dargestellt.

Bei der Zunahme des Potentials $E(t)$ nimmt die Oberflächenkonzentration des Edukts R ab und die des Produkts O nimmt zu. Der Gradient und damit auch der Ladungsfluss nehmen zu bis die Oberflächenkonzentration von R nach Überschreiten des E_0 Potentials verschwindend klein wird. Der Strom erreicht ein Maximum bei E_A . Die Diffusionsschicht, die sich weiter ausdehnt verursacht, dass der Konzentrationsgradient an der Elektrodenoberfläche nahezu unabhängig vom Potential abnimmt. Aus der Cottrell-Gleichung ergibt sich, dass der Strom kleiner wird:

$$i(t) = \frac{nFA * \sqrt{D} * C'_{Ox}}{\sqrt{\pi * t}} \quad (5.2.8)$$

Dabei ist C'_{Ox} die Startkonzentration des Substrats, D dessen Diffusionskonstante. Analoge Prozesse ergeben sich bei abnehmendem Potential. Bei Umkehr der Flussrichtung, die sich aus der potentialabhängigen Umwandlung von Produkt O zum Edukt R ergibt, erfolgt der Fluss eines negativen Stroms, der ein Minimum erreicht und mit abnehmender Konzentration des Produktes in der Diffusionsschicht langsam gegen Null abfällt. Ideal reversible Vorgänge haben besondere Eigenschaften, die im Folgenden genannt werden. Der Prozess ist reversibel, weshalb die Lage der reduktiven und oxidativen Peaks unabhängig von der Potentialvorschubgeschwindigkeit ist. Der Abstand beider Spitzenpotentiale eines Redoxzentrums beträgt:

$$\Delta E = |E_A - E_C| = \frac{59mV}{n} \quad (5.2.9)$$

wobei n die Anzahl der Elektronen ist, die während eines Redoxprozesses umgesetzt werden. Die Halbwertsbreite der Peaks beträgt bei 25 °C unabhängig von der Potentialvorschubgeschwindigkeit (Scan Rate) 28 mV 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:

$$i \approx 2,69 * 10^5 * n^{3/2} * A * C * \sqrt{D * v} \quad (5.2.10)$$

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

$$Q = \frac{E * i}{v} \quad (5.2.11)$$

5.3 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 Diffusionslimitierten Massentransport zur Elektrode. Abbildung 5.3.1 zeigt ein Cyclovoltammogramm einer Redox-Spezies, die auf einer Oberfläche immobilisiert ist.

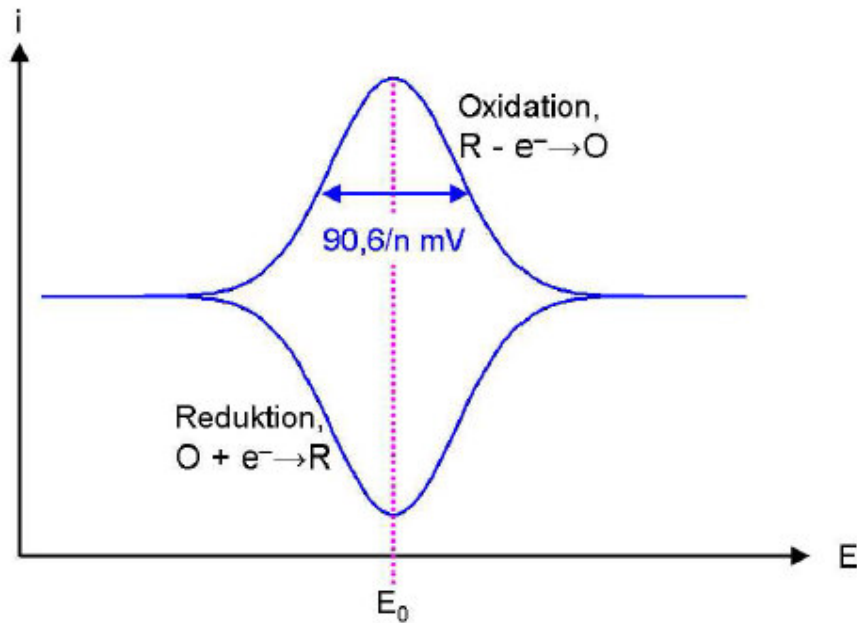


Abb. 5.3.1: Cyclovoltammogramm einer Oberflächenfixierten Redox-Spezies. Die Peaks sind Gauß-förmig und symmetrisch, die Halbwertsbreite beträgt $90,6\text{mV}$ dividiert durch n ³⁰.

Ein Hauptunterschied zwischen Cyclovoltammogrammen von gelösten und Oberflächenfixierten Redox-Spezies ist der, dass die Peaks im letzteren Fall scharf und Gaußförmig 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 oberflächengebundener Redox-Spezies ist die Peak Separation Null und der Peakstrom ist gegeben durch ¹¹⁶:

$$i = \frac{n^2 F^2 A * \nu * \Gamma_{tot}}{4RT} \quad (5.3.1)$$

Dabei ist Γ_{tot} die Oberflächenbelegung der Redox-Moleküle. Die Gleichung sagt aus, dass der Strom und damit die Anzahl der Reaktionen durch die Anzahl der Redox-aktiven Moleküle auf der Oberfläche gegeben sind. Weiterhin ist der Peakstrom proportional zur Scan Rate ν , im Gegensatz zur Abhängigkeit $\propto \sqrt{\nu}$ bei einer diffusionskontrollierten reversiblen Umsetzung von gelösten Redoxmolekülen.

Die Halbwertsbreite eines Redox-Peaks beträgt bei 25°C:

$$\Delta E = 3,353 \frac{RT}{nF} = \frac{90,6mV}{n} \quad (5.3.2)$$

5.4 Elektrochemische Impedanzspektroskopie

Die Elektrochemische Impedanzspektroskopie wird im Allgemeinen zur Untersuchung elektrischer Eigenschaften verschiedener Materialien eingesetzt. Sie findet Anwendung für die Gewinnung von Informationen über die Qualität von Filmüberzügen, zur Aufklärung von Elektrodenvorgängen oder Korrosionsprozessen. Mittlerweile greift die Biotechnologie vermehrt auf diese Methode zu.

Diese Arbeit ist insofern auf diese Methode angewiesen, was die Charakterisierung der verwendeten künstlichen Membransysteme betrifft. Dabei wird mit dieser Methode überprüft, wie sich die elektrischen Eigenschaften an der Grenzfläche zur Substratoberfläche über den Zeitraum der Präparation entwickeln. Damit können Rückschlüsse auf die Qualität des Systems, insbesondere der Membran getätigt werden. Ein wesentliches Indiz für die Bildung der Membran ist der Anstieg des Widerstandes und der Abfall der Kapazität.

Grundlegend für die Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS) ist die Messung der Phasen- und Stromantwort, die eine Probe auf eine angelegte Wechselspannung gibt. Die erhaltenen Daten der EIS werden analysiert und können Aufschluss darüber geben, wie sich das System hinsichtlich seiner elektrischen Eigenschaften zusammensetzt. In dieser Arbeit werden Frequenzen vom Milli-Hertz bis zum Mega-Hertz Bereich durchlaufen. Die Information über Systemelemente unterschiedlicher elektrischer Eigenschaften kommen in verschiedenen Frequenzbereichen zu unterschiedlichen Anteilen zum tragen. Beispielsweise ist die Impedanz einer Kapazität wegen $|Z| = \frac{1}{\omega c}$ hoch für geringe Frequenzen und niedrig für hohe Frequenzen, während hingegen dann andere Elemente eine hohe Impedanz aufweisen können.

5.5 Die elektrische Doppelschicht

In der Elektrolytlösung verhält sich eine Goldoberfläche wie eine ideal polarisierte Elektrode, da kein Ladungstransfer zwischen Metalloberfläche und Lösung stattfindet. Die Grenzfläche und die Bulkphase können zusammen als Kondensator aufgefasst werden. Es handelt sich um die so genannte elektrische Doppelschicht, die von Helmholtz als Modell beschrieben wurde. Nach diesem Modell besteht die Doppelschicht aus einer einfachen Ionenschicht, die sich an die Elektrode angelagert hat (siehe dazu Abbildung 5.5.1).

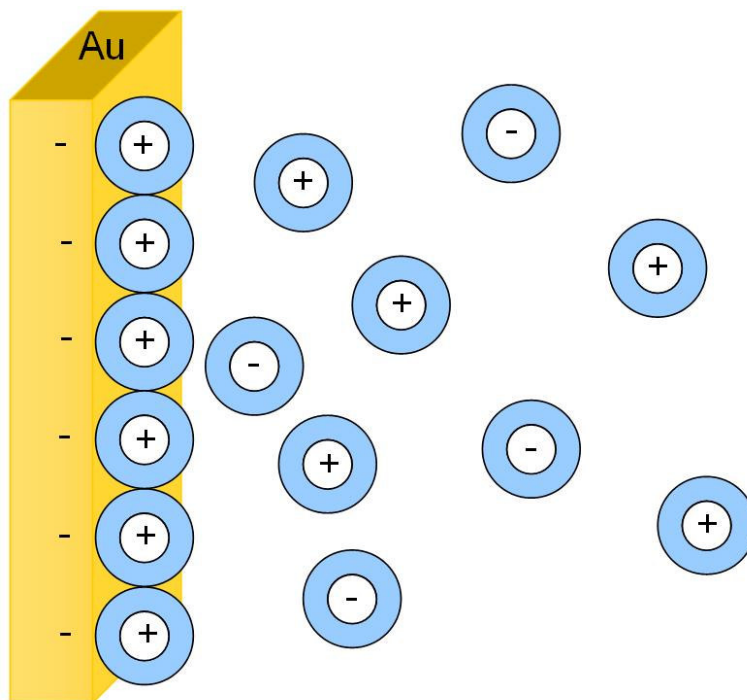


Abb. 5.5.1: Im einfachen Helmholtz-Modell einer elektrischen Doppelschicht lagert sich an einer negativ geladenen Elektrode eine Schicht aus positiven Ionen an

Im Laufe der Zeit hat sich ein differenzierteres Bild durchgesetzt: nach diesem besteht die Doppelschicht auf der Seite der Lösung aus mehreren unterteilten Zonen, was in Abbildung 5.5.2 gezeigt wird.

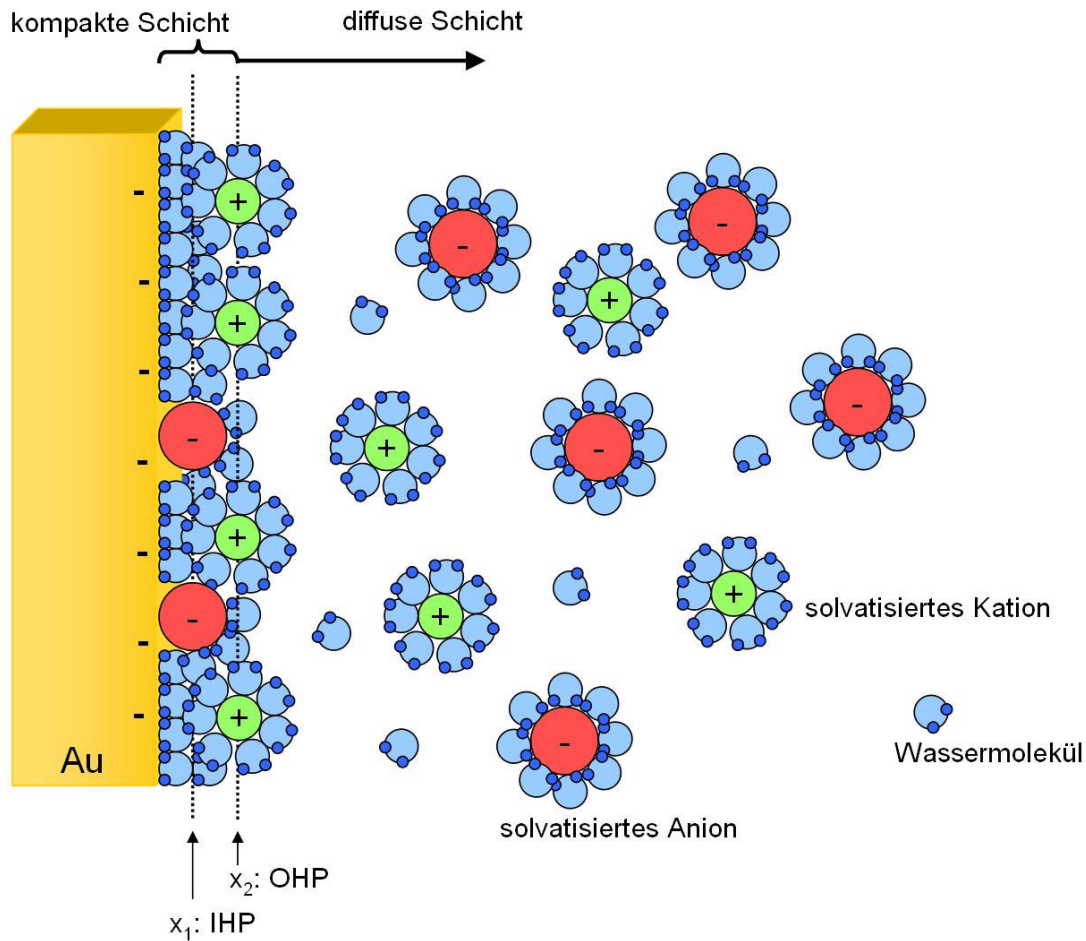


Abb. 5.5.2: Ein differenzierteres Modell für die Doppelschicht Region: Es bildet sich auf der Seite der Lösung eine kompakte Schicht aus spezifisch adsorbierten Ionen und Lösungsmittel. Unspezifisch adsorbierte Ionen sind über die diffuse Schicht verteilt.

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 Schicht oder auch Sternschicht genannt. Der Abstand dieser Schicht von der Elektrode wird „Innere Helmholtz-Ebene“ (IHP) genannt. Gelöste Ionen können sich der Elektrode nur bis auf einen Abstand x_2 nähern, die „Äußere Helmholtz-Ebene“ (OHP) genannt wird. Die Lage dieser Ionenschicht wird mit der Ebene gleichgesetzt,

die durch die Rumpfe der solvatisierten Ionen verläuft. Das Helmholtz-Modell ignoriert die störenden Effekte der thermischen Bewegung der Ionen, die der starren Anordnung der Ladungsschicht entgegenwirkt.

Dieser Effekt wird im Gouy-Chapman-Modell der „diffusen Doppelschicht“ in ganz ähnlicher Weise berücksichtigt wie im Debye-Hückel-Modell der Ionenwolke eines Ions, nur dass das einzelne Zentral-Ion durch eine unendlich ausgedehnte, ebene Elektrodenoberfläche ersetzt ist.

In der „Äußere Helmholtz-Ebene“ oder auch „diffusen Doppelschicht“ halten sich vermehrt entgegengesetzt zur Elektrode geladene Ionen auf, während gleich geladene Ionen von ihr abgestoßen werden ¹¹⁷.

5.6 Messprinzip der elektrochemischen Impedanzspektroskopie

Als Impedanz wird der Wechselstromwiderstand eines Systems bezeichnet. In den Systemen aus Metallelektrode und Lösung liegen vor allem ohmsche Widerstände und Kapazitäten als äquivalente Schaltelemente vor. Induktive Elemente sind in diesen Fällen nicht von Bedeutung, weshalb sie in diesem Abschnitt nicht erwähnt werden. Für die Anregung eines Systems durch eine Wechselspannung werden aufgrund der kapazitiven Elemente Phasenverschiebungen in der Stromantwort hervorgerufen. Ohmsche Widerstände hingegen sind nicht frequenzabhängig. Die Impedanz wird zerlegt in einen Real- und einen Imaginärteil. Der Betrag des Vektors entspricht dabei der Impedanz und der eingeschlossene Winkel zwischen Vektor und x-Achse entspricht dem Phasenwinkel. Das zu untersuchende System wird mit einem elektrischen Signal, meist einer sinusförmigen Wechselspannung zwischen 1 mHz und 1 MHz, angeregt. Die Stromantwort wird aufgezeichnet und in verschiedenen Darstellungen aufgetragen. Es wird eine Drei-Elektroden-Anordnung verwendet. Es gibt eine Arbeitselektrode (WE), an welche die Wechselspannung angelegt wird. Mit einer Gegenelektrode (CE) wird das Antwortsignal aufgezeichnet. Eine Referenzelektrode (RE) dient als Referenzpunkt, um die Potentialdifferenz zu messen. Zwischen Arbeits- und Referenzelektrode fließt nur ein sehr kleiner Strom, um einen Ohmschen Spannungsabfall zu vermeiden. Bei diesen Messungen werden nur sehr kleine Amplituden von 5 bis 10 mV zur Anregung verwendet, um Nichtlinearität in der Stromantwort zu vermeiden.

Die Anregung

$$E(t) = E_0 * \sin(\omega t) \quad (5.6.1)$$

ruft einen Antwortstrom $I(t)$, der um die Phase Φ verschoben ist hervor:

$$I(t) = I_0 * \sin(\omega t + \Phi) \quad (5.6.2)$$

Die Impedanz errechnet sich dann aus:

$$Z(t) = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 * \sin(\omega t)}{I_0 * \sin(\omega t + \Phi)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \Phi)} \quad (5.6.3)$$

Die Eulersche Relation $e^{i\Phi} = \cos \Phi + i \sin \Phi$ lässt zu, dass sich die Wechselstromgrößen in folgender komplexer Weise schreiben lassen:

$$E(t) = E_0 * e^{i\omega t} \quad (5.6.4)$$

$$I(t) = I_0 * e^{i\omega t - \Phi} \quad (5.6.5)$$

Dementsprechend ergibt sich für die Impedanz:

$$Z(t) = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 * e^{i\omega t}}{I_0 * e^{i\omega t - \Phi}} = \frac{E_0}{I_0} e^{i\Phi} = |Z| * e^{i\Phi} = Z' + Z'' \quad (5.6.6)$$

somit ist die Impedanz nicht zeit- aber frequenzabhängig.

Der Realteil, die Resistanz und der Imaginärteil, die Reaktanz der komplexen Impedanz sind nach der Eulerschen Relation durch

$$Z' = \Re(Z) = |Z| * \cos \phi \quad (5.6.7)$$

und

$$Z'' = \Im(Z) = |Z| * \sin \phi \quad (5.6.8)$$

gegeben. In Abbildung 5.6.1 ist die komplexe Impedanz graphisch dargestellt.

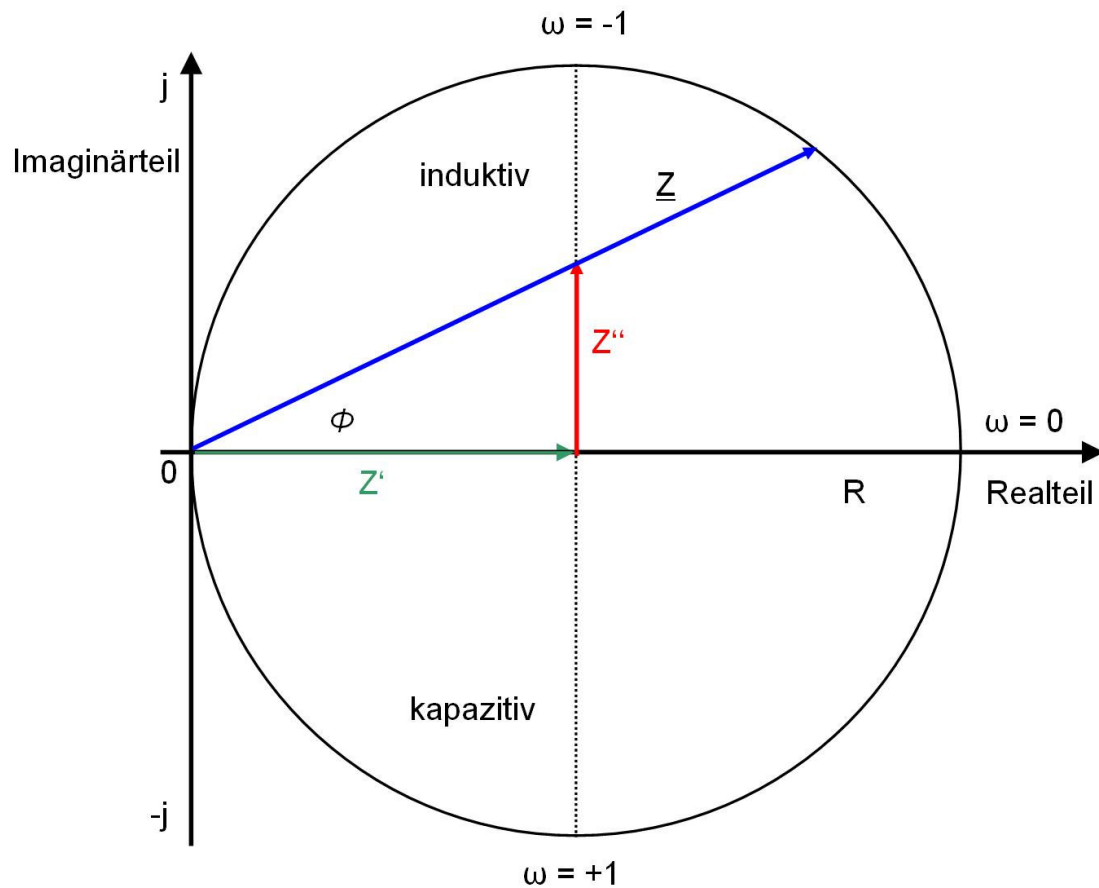


Abb. 5.6.1: Impedanz in der komplexen Ebene. Z' ist der Realteil, Z'' ist der Imaginärteil.

Zusätzlich gelten folgende Zusammenhänge:

$$|Z| = \sqrt{(Z')^2 + (Z'')^2} \quad (5.6.9)$$

$$\Phi = \arctan\left(\frac{Z''}{Z'}\right) \quad (5.6.10)$$

Die komplexe Leitfähigkeit, die Admittanz Y ist der Kehrwert der Impedanz Z :

$$\begin{aligned} Y &= Y' + iY'' = \frac{1}{Z} \\ &= \frac{1}{Z' + iZ''} = \frac{Z'}{(Z')^2 + (Z'')^2} - \frac{iZ''}{(Z')^2 + (Z'')^2} \end{aligned} \quad (5.6.11)$$

mit

$$Y' = \frac{Z'}{(Z')^2 + (Z'')^2} \quad (5.6.12)$$

und

$$Y'' = -\frac{iZ''}{(Z')^2 + (Z'')^2} \quad (5.6.13)$$

Es bieten sich verschiedene Darstellungsarten an, welche in dieser Arbeit Anwendung finden:

Der Bode Plot: Im Bode Plot werden einerseits der Betrag der Impedanz $|Z|$ und andererseits die Phase Φ in Abhängigkeit der Anregungsfrequenz aufgetragen. Es werden sowohl die Frequenz, als auch die Impedanz auf logarithmischen Skalen dargestellt.

Der Nyquist Plot: Im Nyquist Plot wird der Imaginärteil (Z'') der Impedanz gegen den Realteil (Z') der Impedanz aufgetragen. In dieser Darstellung ist keine Information über die Phase enthalten.

Der frequenzreduzierte Admittanz Plot: Im Admittanz Plot werden die Admittanzen Y' (Realteil) und Y'' (Imaginärteil) jeweils durch die Frequenz dividiert und gegeneinander aufgetragen.

Für das gemessene System kann ein äquivalentes Ersatzschaltbild gefunden werden, das die elektrischen Eigenschaften des Systems physikalisch erklärt. Mit Hilfe eines passenden Modells können die erhaltenen Daten angefitet werden. Mögliche Schaltkreiselemente, die dem Modell zur Verfügung stehen werden im Folgenden aufgelistet.

Der Ohmsche Widerstand R: Ein Ohmscher Widerstand liegt dann vor, wenn der Phasenwinkel sich nicht mit der Frequenz ändert, denn R zeichnet sich vor allen anderen Elementen durch seine Frequenzunabhängigkeit aus.

Die Kapazität C: Für eine Kapazität im Wechselstromkreis gilt:

$$Z(C) = -\frac{i}{\omega C} \quad (5.6.14)$$

sodass $\Re(Z) = Z' = 0$ und $\Im(Z) = Z'' < 0$ und damit $\Phi = \arctan\left(\frac{Z''}{Z'}\right) = -90^\circ$ gilt. Für ein rein kapazitives System beträgt der Phasenwinkel also für alle Frequenzen -90° .

Das konstante Phasenelement CPE: Oft enthalten Systeme kapazitive Elemente, die von idealen Kapazitäten abweichen. Dies wird meist hervorgerufen durch Inhomogenitäten, die auf mikroskopische Materialeigenschaften, wie Kanten und Stufen oder Inhomogenitäten in ultradünnen Filmen auf der Substratoberfläche, zurückzuführen sind. Bei dem CPE-Glied handelt es sich um Verteilungen von Kapazitäten, wobei die Impedanz durch

$$Z(CPE) = \frac{A}{(i\omega)^\alpha} \quad (5.6.15)$$

gegeben ist. A ist hierbei eine frequenzunabhängige reelle Konstante und für α gilt: $0 < \alpha < 1$. Die Kapazität eines CPE-Gliedes wird einerseits durch den Wert CPE_1-P charakterisiert, der einer reinen Kapazität entspricht und andererseits gibt der Wert für α CPE_1-T an, wie hoch die Abweichung von einer reinen Kapazität ist.

Für gemischte Systemen, wie solche, die in dieser Arbeit untersucht werden, kommt es zu Überlagerungen der Impedanzen der genannten Elemente³⁰.

Kapitel 6

Weitere Messmethoden

6.1 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Rasterkraftmikroskopie oder auch Atomkraftmikroskopie ¹¹⁸⁻¹²⁰ (engl. „Atomic Force Microscopy“) ist eine Weiterentwicklung der Rastertunnelmikroskopie. Bei der Rastertunnelmikroskopie wird der extrem abstandsempfindliche Tunnelstrom zwischen einer feinen Spitze und der Probenoberfläche, die elektrisch leitfähig sein muss, gemessen.

Bei der Rasterkraftmikroskopie wird hingegen die Kraft gemessen, die zwischen einer scharfen Spitze und der zu untersuchenden Probenoberfläche herrscht. Die Spitze ist am Ende einer kleinen Blattfeder, dem Cantilever befestigt. Meist besteht der Cantilever aus Silizium oder Siliziumnitrid, der Krümmungsradius der Spitze liegt in der Größenordnung von 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, welche durch eine optische Methode detektiert werden kann. Hierbei wird ein fein fokussierter Laserstrahl auf der Rückseite des Cantilevers reflektiert und gelangt über einen oder mehrere Ablenkspiegel in einen Photodetektor, welcher in vier Segmente unterteilt ist. Mit Hilfe dieser vier Segmente kann sowohl die vertikale als auch horizontale Verbiegung des Cantilevers gemessen werden.

Das Funktionsprinzip eines Rasterkraftmikroskopes ist in Abbildung 6.1.1 gezeigt.

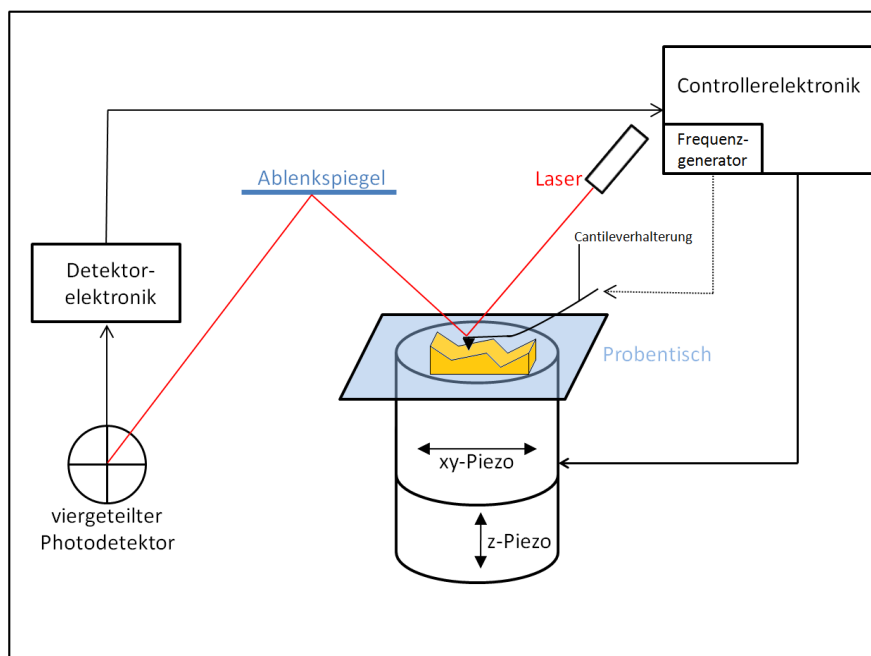


Abb. 6.1.1: Funktionsprinzip eines Atomkraftmikroskops

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

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.

6.2 Dynamische Lichtstreuung

Die Lichtstreuung stellt eine wichtige und damit weit verbreitete Methode zur Charakterisierung von Makromolekülen bzw. Metall-Nanopartikeln in Lösung dar. In einem Lichtstreuexperiment wird ein Laserstrahl auf eine Probe gelenkt. Das Licht wird von der Probe gestreut, wobei das Streulicht mit Hilfe eines Detektors in verschiedenen Winkelpositionen relativ zum Primärstrahl detektiert wird. Die Streuintensität ist abhängig von der Art und Konzentration der streuenden Teilchen, von deren Größe, sowie deren Bewegung und dem Winkel, unter dem man die Teilchen beobachtet. Die gemessenen Streuintensitäten werden entweder über einen längeren Zeitraum gemittelt (statische Lichtstreuung), oder man detektiert und untersucht die zeitliche Fluktuation der Streuintensität (Dynamische Lichtstreuung). In dieser Diplomarbeit wurde ausschließlich die Methode der dynamischen Lichtstreuung verwendet, weswegen an dieser Stelle nur auf die dynamische Lichtstreuung eingegangen wird.

Die zeitlichen Fluktuationen der Streuintensität, die bei dem dynamischen Lichtstreuexperiment detektiert werden, sind winkelabhängig. Diese Winkelabhängigkeit wird einerseits durch die Positionsänderung der beobachteten Teilchen, verursacht durch die zufällige thermische Bewegung (Brownsche Molekularbewegung), andererseits durch die Interferenzen der verschiedenen Streuzentren bedingt. Mittels dynamischer Lichtstreuung wird der hydrodynamische Radius (R_H), der Diffusionskoeffizient (D) sowie die Polydispersität der gelösten Teilchen bestimmt. Im Gegensatz zum statischen Lichtstreuexperiment werden die gemessenen Fluktuationen der Streuintensität nicht gemittelt, sondern mit sich selbst korreliert. Dies führt zur folgenden Autokorrelationsfunktion ($g_2(\tau)$) der Streuintensität:

$$g_2(\tau) = \langle I(0)I(\tau) \rangle_t \quad (6.2.1)$$

Mit $I(0)$ Streuintensität zum Zeitpunkt t , $I(\tau)$ Streuintensität zum Zeitpunkt $t+\tau$ und $\langle \dots \rangle$ zeitliches Mittel.

Durch die Korrelation wird das Signal, welches normalerweise um eine mittlere Intensität fluktuiert, in eine typischerweise monoton abklingende Funktion überführt. Trägt man nun $g_2(\tau)$ gegen τ auf, so erhält man, wenn man rein diffusive Prozesse untersucht, einen exponentiellen Abfall von $\langle I^2 \rangle$ auf $\langle I \rangle^2$, wobei dies streng genommen nur für monodisperse Proben gilt. Gemäß der Siegert-Relation (Gleichung 6.3.2) erhält man aus $g_2(\tau)$ und der ebenfalls experimentell bestimmbaren Basislinie A die Autokorrelationsfunktion des elektrischen Feldes $g_1(\tau)$, die zur Auswertung der Messdaten verwendet wird.

$$g_1(\tau) = \langle E(q,t)E(q,t+\tau) \rangle = \sqrt{\frac{g_2(\tau) - A}{A}} \quad (6.2.2)$$

Mit E den Streuamplituden zum Zeitpunkt t und $t+\tau$ und A der Basislinie, wobei $A = \langle I \rangle^2$. Falls die Bewegung der Teilchen im Streuvolumen rein diffusiv ist, so gilt für monodisperse Teilchen folgender Zusammenhang:

$$g_1(q, \tau) = B e^{(-q^2 D \tau)} \quad (6.2.3)$$

Hierbei sind B die Amplitude der Korrelationsfunktion, D der Diffusionskoeffizient und q der Streuvektor.

Hierbei wird der Betrag des Streuvektors q wie folgt definiert:

$$q = \frac{4\pi n_D \sin(\theta)}{\lambda} \quad (6.2.4)$$

Wobei θ für den Streuwinkel, λ für die Wellenlänge des eingesetzten Lasers und n_D für den Brechungsindex des Lösungsmittels steht.

Für polydisperse, kleine (< 20 nm) Proben-Teilchen ergibt sich $g_1(\tau)$ dagegen aus der Summe der Exponentialfunktionen der einzelnen Komponenten, gewichtet mit m_i und M_i :

$$g_1(q, \tau) = B \frac{\sum m_i M_i \exp(-q^2 D_i \tau)}{\sum m_i M_i} \quad (6.2.5)$$

Mit D_i dem Diffusionskoeffizient der Teilchensorte i , m_i dem Massenteil der Teilchensorte i sowie M_i der Molmasse der Teilchensorte i .

Für größere polydisperse Teilchen muss aufgrund intrapartikulärer Interferenzen der Formfaktor $P(q)$ berücksichtigt werden. Dieser muss dann in Gleichung 6.2.5 sowohl im Nenner als auch im Zähler auftauchen.

Trägt man logarithmisch $g_1(\tau)$ gegen τ auf, so erhält man aus der Anfangssteigung dieser Auftragung D_{app} . Trägt man nun D_{app} gegen q^2 auf, so erhält man aus dem Achsenabschnitt das z-Mittel D_z des Diffusionskoeffizienten:

$$D_z = \lim_{q \rightarrow 0} D_{app}(q) \quad (6.2.6)$$

mit

$$\left[\frac{-d(\ln g_1(\tau))}{d\tau} \right]_{\tau \rightarrow 0} = q^2 \frac{\sum m_i M_i P_i(q) D_i}{\sum m_i M_i P_i(q)} = q^2 D_{app}(q) \quad (6.2.7)$$

Eine Überlagerung vieler Exponentialfunktionen ist nach Gleichung 6.3.5 praktisch nicht auswertbar. Daher erfolgt die Datenanalyse nach der Methode des „Kumulantenfits“, also einer Potenzreihenentwicklung der logarithmischen Autokorrelationsfunktion:

$$\ln g_1(\tau) = -\kappa_1 \tau + \frac{1}{2!} \kappa_2 \tau^2 - \frac{1}{3!} \kappa_3 \tau^3 + \dots \quad (6.2.8)$$

mit κ_n Kumulant n-ter Ordnung.

Der erste Kumulant K_1 dieser Näherung liefert in Abhängigkeit vom Streuvektor q den scheinbaren Diffusionskoeffizienten D_{app} , der wie folgt definiert ist:

$$D_{app} = \frac{K_1}{q^2} \quad (6.2.9)$$

Der zweite Kumulant K_2 dagegen beschreibt die Abweichung vom monoexponentiellen Verhalten. K_2 ermöglicht eine Abschätzung der Polydispersität der Probe. Man spricht von weitgehend monodispersen Proben bei Werten bis etwa 0.05, während Werte über 0.1 auf eine deutliche Polydispersität hinweisen.

Analog dem Zimm-Plot in der statischen Lichtstreuung erhält man nun aus der doppelten Extrapolation für $c \rightarrow 0$ und $q \rightarrow 0$ der Reihenentwicklung des scheinbaren Diffusionskoeffizienten nach Gleichung (6.10) das z-Mittel des Diffusionskoeffizienten D_z :

$$D_{app}(q, c) = D_z \left(1 + C \langle R_g^2 \rangle_z q^2 + \dots \right) (1 + k_d c + \dots) \quad (6.2.10)$$

C dimensionslose Größe, Abhängig von der Molekülstruktur

k_d $k_d = 2A_2 - k_f - v_p$

k_f $f = f_0(1 + k_f c + \dots)$

f Reibungskoeffizient

A_2 zweiter Virialkoeffizient

v_p partielles Molvolumen des Polymers

Mit der Stokes-Einstein-Gleichung lässt sich schließlich mit der Viskosität η_0 des Lösungsmittels der kugeläquivalente hydrodynamische Radius R_H der Teilchen berechnen:

$$R_H = \left\langle \frac{1}{R_H} \right\rangle_z^{-1} = \frac{kT}{6\pi\eta_0 D_z} \quad (6.2.11)$$

Eine ausführlichere und umfassendere Abhandlung über Lichtstreuung findet sich in der Literatur¹²¹⁻¹²³.

6.3 UV-Vis Spektroskopie

Die UV-Vis Spektroskopie wurde für diese angefertigte Arbeit zum Messen der optischen Dichten der hergestellten Gold- sowie Silber-Kolloid Lösungen verwendet.

Eine UV-Vis Messung deckt sowohl den kompletten, für das menschliche Auge sichtbaren, Bereich als auch den Ultravioletten Bereich des elektromagnetischen Spektrums ab. Dieser Bereich geht von 400 nm bis 800 nm Wellenlänge. Dieser Teil stellt den Vis (visiblen) Teil des UV-Vis Spektrums dar. An den unteren Teil des Vis-Spektrums gliedert sich der UV Teil an, der von 400 nm Wellenlänge bis hinab zu 10 nm Wellenlänge reicht. Der UV Teil des elektromagnetischen Spektrums wird seinerseits wieder in einen nahen und fernen UV Teil unterteilt. Dabei erstreckt sich der nahe UV Teil von 400 bis 200 nm, während sich der ferne UV Teil von 200 bis 10 nm Wellenlänge erstreckt. Das von uns verwendete UV-Vis Spektrometer deckt den Wellenlängenbereich von 200 bis 800 nm ab.

Im Experiment wird das aus der Lichtquelle (Wolfram- oder Xenonlampe) tretende Licht in einem Monochromator nach Wellenlängen zerlegt und in zwei Strahlen geteilt. Der eine Strahl durchläuft die Probenküvette, der andere Strahl eine Vergleichsküvette, welche identisch gebaut und mit dem verwendeten Lösungsmittel gefüllt ist. Ein Detektor misst den Absorptionsunterschied, welcher durch den in der Probenküvette gelösten Stoff verursacht wird. Dieser Absorptionsunterschied wird in einem wellenlängenabhängigen Spektrum aufgenommen. Bei einem Absorptionsvorgang wird aus dem Licht, welches auf die Probe fällt, der Lichtanteil mit der geeigneten Frequenz ν von dem Molekül aufgenommen, um von dem elektronischen Grundzustand ψ_0 des Moleküls in dessen angeregten Zustand ψ_i angeregt zu werden. Dabei ist die Frequenz bzw. Wellenlänge, die aus dem elektromagnetischen Spektrum absorbiert wird, charakteristisch für die jeweilige Substanz. Fällt nun ein Lichtstrahl der Intensität I_0 auf ein homogenes, isotropes Medium der Schichtdicke d , dann kann er abgesehen von Reflexions- und Streuverlusten durch die Absorption geschwächt werden. Für die Intensität I des austretenden Strahls (Transmission) gilt dann:

$$I = I_0 - I_{abs} \quad (6.3.1)$$

Aus dem differentiellen Ansatz für die Abnahme der Intensität dI bei einem Inkrement dx für die Schichtdicke

$$dI = -\alpha * I * dx \quad (6.3.2)$$

erhält man durch Auswertung des Integrals

$$\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = - \int_0^d \alpha dx \quad (6.3.3)$$

die Funktion

$$I = I_0 * e^{-\alpha d} \quad (6.3.4)$$

α ist dabei ein für das zu untersuchende Medium charakteristischer Absorptionskoeffizient. Bezieht man sich, wie in unserem Fall, auf verdünnte Lösungen, bei denen ausschließlich der gelöste Stoff der Konzentration c absorbiert, dann ersetzt man α durch $2,303 * \epsilon * c$ und man erhält:

$$\ln \frac{I_0}{I} = 2,303 * \epsilon * c * d \quad (6.3.5)$$

Die Absorption A , auch Extinktion genannt, ist eine dimensionslose Konstante und der molare Absorptionskoeffizient ϵ hat die Dimension $L * mol^{-1} * cm^{-1}$. Dieses Gesetz geht auf Bouguer, Lambert und Beer zurück und heißt Bouguer-Lambert-Beer'sches Gesetz. Bestimmt man nun nach diesem Gesetz für alle Wellenlängen λ die Absorption und daraus die substanzspezifische Größe ϵ , dann gewinnt man die Absorptionskurve $\epsilon(\lambda)$ und damit das UV-Vis Spektrum.

Untersucht man Moleküle in Lösungen, so sind deren Orbitalenergien, auf Grund verschieden starker Solvatisierung der einzelnen Moleküle, leicht unterschiedlich. Dies führt dazu, dass man keine genau definierten Linienspektren, sondern breite Absorptionsbanden detektiert. Bei der Spektroskopie an Kolloiden kommen noch die Existenz zahlreicher Orbitale mit ähnlichen Energien sowie die Polydispersität der Proben als Ursachen für breite Absorptionsbanden hinzu ^{122, 124}.

Kapitel 7

Messaufbau für Experimente der elektrochemisch gesteuerten ATR-FTIR-Spektroskopie

7.1 FTIR-Messaufbau

Die FTIR-Messungen werden am FTIR-Spektrometer Vertex 70 von Bruker durchgeführt. Das Spektrometer ist mit einer luftgekühlten Global-Infrarotquelle, einem RockSolid-Interferometer und einem photovoltaischen MCT-Detektor ausgestattet. Es wird standardmäßig mit einer Auflösung von $\Delta\nu = 4 \text{ cm}^{-1}$ gemessen, zur Reduktion der Messzeit in zeitaufgelösten Experimenten auch mit $\Delta\nu = 8 \text{ cm}^{-1}$. Es wurde mit der Auswertesoftware OPUS 6.0 von Bruker gearbeitet.

Für statische Messungen wurde eine Spiegelgeschwindigkeit von 60 kHz verwendet, während eine Spiegelgeschwindigkeit von 120 kHz für zeitaufgelöste Messungen gewählt wurde.

7.2 Der ATR-Kristall

Die trapezförmigen ATR-Kristalle aus Silizium ($n = 3,42$) wurden von der Firma Korth-Kristalle gefertigt (siehe Abbildung 7.2.1).

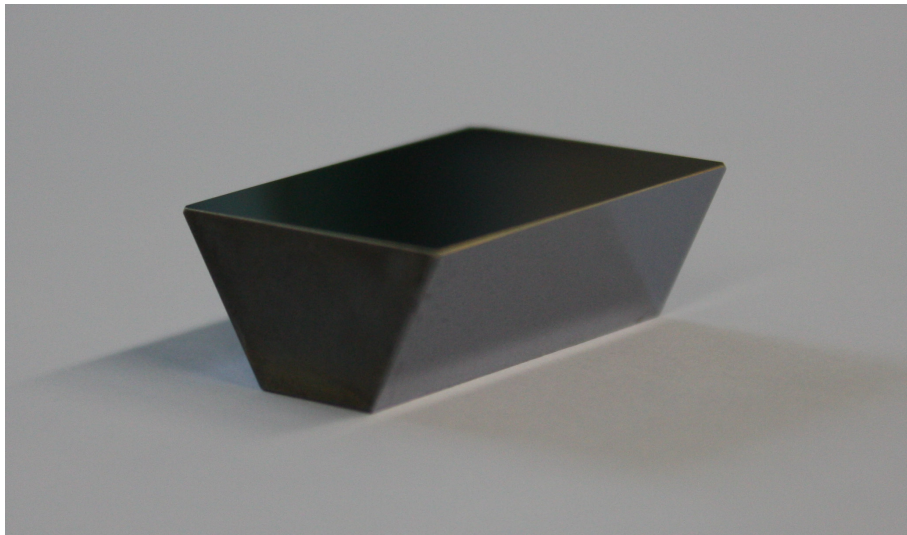


Abb. 7.2.1: Der ATR-Kristall aus Silizium

Die Fläche, welche vom IR-Strahl beleuchtet wird, ist kreisförmig und hat einen Durchmesser von etwa 5mm, was in Abbildung 7.2.2 gezeigt wird.

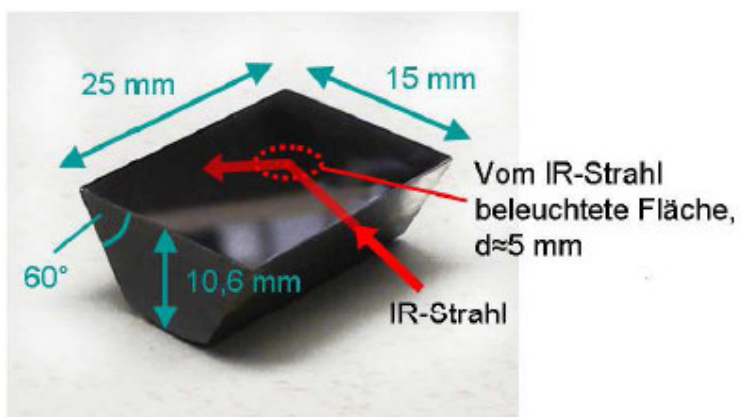


Abb. 7.2.2: Der ATR-Kristall aus Silizium mit eingekoppeltem IR-Strahl ³⁰

Abbildung 7.2.3 zeigt einen trapezförmigen ATR-Kristall, nach dem Aufwachsen der „Two-Layer-Gold-Surface“, welche im Ergebnisteil (Seite 127) beschrieben ist.

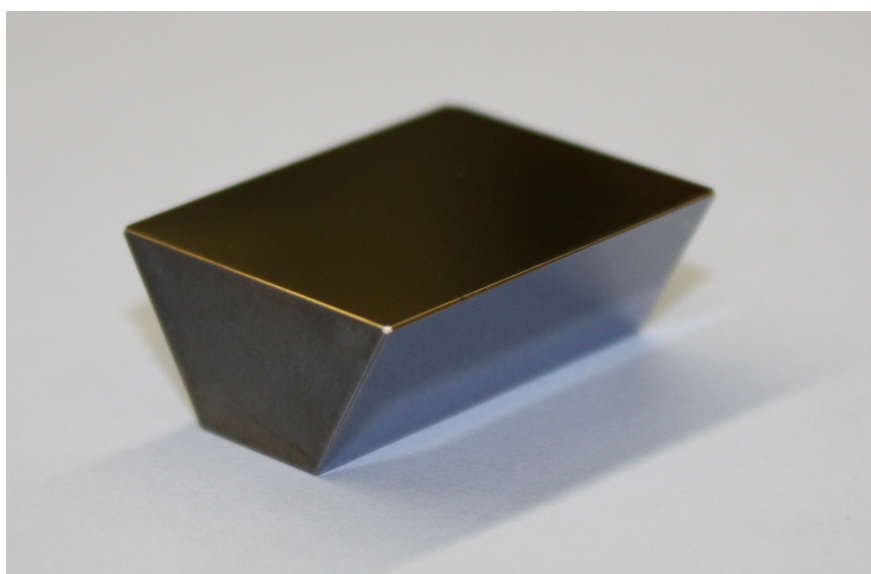


Abb. 7.2.3: ATR-Kristall mit der Aufgewachsenen „Two-Layer-Gold-Surface“

7.3 Der Probenkammereinsatz und die spektroelektrochemische Messzelle

Der Einsatz für die Probenkammer mit Messzelle ist in Abbildung 7.3.1 und 7.3.2 gezeigt. Die Messzelle sowie die Probenhalterung wurden in [30] entwickelt und unverändert weiter verwendet.

Der Infrarotstrahl wird durch einen Polarisator und einen Filter in den trapezförmigen 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 ein Inlet und Outlet ausgetauscht werden. Die Messzelle ermöglicht in einer Drei-Elektroden-Konfiguration elektrochemische Messungen, wobei die Goldelektrode („Two-Layer-Gold-Surface“) als Arbeitselektrode genutzt wird. Gegenelektrode und Referenzelektrode tauchen in die Pufferlösung. Als Gegenelektrode dient ein gewickelter Platindraht. Die Referenzelektrode ist eine Ag/AgCl-Elektrode³⁰.

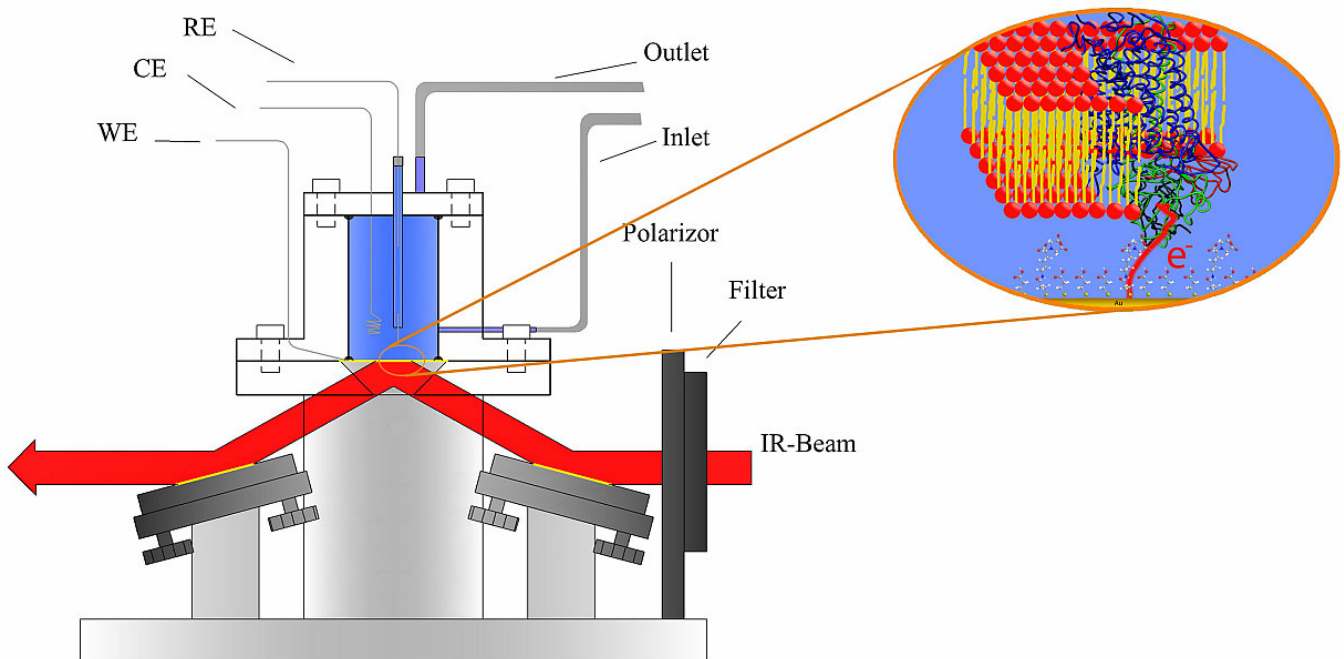
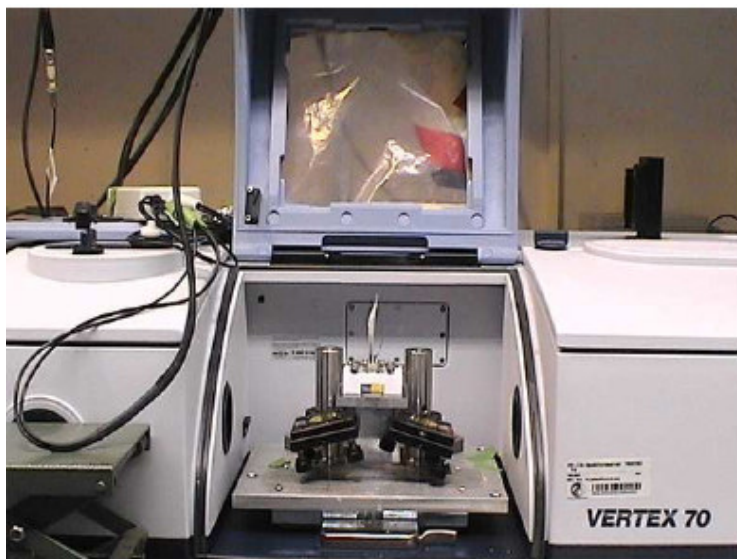
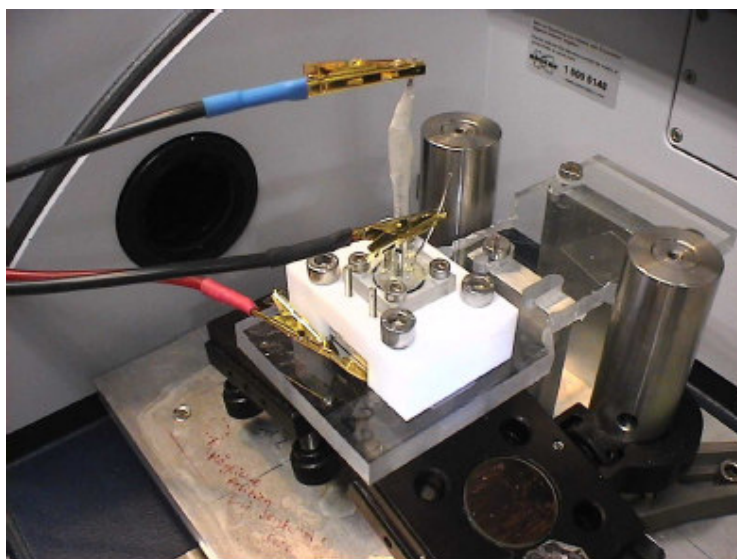


Abb.7.3.1: Einsatz für die Probenkammer des FTIR-Spektrometers mit Messzelle. WE: Working Electrode (Arbeitselektrode), CE: Counter Electrode (Gegenelektrode), RE: Reference Electrode (Referenzelektrode).



(a)



(b)

Abb. 7.3.2: 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 ³⁰.

Kapitel 8

Ergebnisse

&

Diskussion

Publikationen

**A Two-Layer Gold Surface with Improved Surface Enhancement for Spectro-
Electrochemistry Using Surface-Enhancement Infrared Absorption Spectroscopy**

Applied Spectroscopy, 63, 1068-1074 (2009)

**A Two-Layer Gold Surface with Improved Surface Enhancement for Spectro-
Electrochemistry Using Surface-Enhancement Infrared Absorption Spectroscopy**

Applied Spectroscopy, 63, 1068-1074 (2009)

**A Two-Layer Gold Surface with Improved Surface Enhancement for Spectro-
Electrochemistry Using Surface-Enhancement Infrared Absorption Spectroscopy**

Applied Spectroscopy, 63, 1068-1074 (2009)

**A Two-Layer Gold Surface with Improved Surface Enhancement for Spectro-
Electrochemistry Using Surface-Enhancement Infrared Absorption Spectroscopy**

Applied Spectroscopy, 63, 1068-1074 (2009)

**A Two-Layer Gold Surface with Improved Surface Enhancement for Spectro-
Electrochemistry Using Surface-Enhancement Infrared Absorption Spectroscopy**

Applied Spectroscopy, 63, 1068-1074 (2009)

**A Two-Layer Gold Surface with Improved Surface Enhancement for Spectro-
Electrochemistry Using Surface-Enhancement Infrared Absorption Spectroscopy**

Applied Spectroscopy, 63, 1068-1074 (2009)

**A Two-Layer Gold Surface with Improved Surface Enhancement for Spectro-
Electrochemistry Using Surface-Enhancement Infrared Absorption Spectroscopy**

Applied Spectroscopy, 63, 1068-1074 (2009)

**Silver Surfaces with Optimized Surface Enhancement by Self-Assembly of Silver
Nanoparticles for Spectroelectrochemical Applications**

J. Phys. Chem. C, 113,17698-17704 (2009)

**Silver Surfaces with Optimized Surface Enhancement by Self-Assembly of Silver
Nanoparticles for Spectroelectrochemical Applications**

J. Phys. Chem. C, 113,17698-17704 (2009)

**Silver Surfaces with Optimized Surface Enhancement by Self-Assembly of Silver
Nanoparticles for Spectroelectrochemical Applications**

J. Phys. Chem. C, 113,17698-17704 (2009)

**Silver Surfaces with Optimized Surface Enhancement by Self-Assembly of Silver
Nanoparticles for Spectroelectrochemical Applications**

J. Phys. Chem. C, 113,17698-17704 (2009)

**Silver Surfaces with Optimized Surface Enhancement by Self-Assembly of Silver
Nanoparticles for Spectroelectrochemical Applications**

J. Phys. Chem. C, 113,17698-17704 (2009)

**Silver Surfaces with Optimized Surface Enhancement by Self-Assembly of Silver
Nanoparticles for Spectroelectrochemical Applications**

J. Phys. Chem. C, 113,17698-17704 (2009)

**Silver Surfaces with Optimized Surface Enhancement by Self-Assembly of Silver
Nanoparticles for Spectroelectrochemical Applications**

J. Phys. Chem. C, 113,17698-17704 (2009)

Time-resolved surface-enhanced resonance Raman spectro-electrochemistry of heme proteins

Spectroscopy, 24, 125-129 (2010)

Time-resolved surface-enhanced resonance Raman spectro-electrochemistry of heme proteins

Spectroscopy, 24, 125-129 (2010)

Time-resolved surface-enhanced resonance Raman spectro-electrochemistry of heme proteins

Spectroscopy, 24, 125-129 (2010)

Time-resolved surface-enhanced resonance Raman spectro-electrochemistry of heme proteins

Spectroscopy, 24, 125-129 (2010)

Time-resolved surface-enhanced resonance Raman spectro-electrochemistry of heme proteins

Spectroscopy, 24, 125-129 (2010)

Electron Transfer Kinetics of Cytochrome C in the Submillisecond Time Regime Using Time-Resolved Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy

J. Phys. Chem. C, 113, 2256-2262 (2009)

Electron Transfer Kinetics of Cytochrome C in the Submillisecond Time Regime Using Time-Resolved Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy

J. Phys. Chem. C, 113, 2256-2262 (2009)

**Electron Transfer Kinetics of Cytochrome C in the Submillisecond Time Regime Using
Time-Resolved Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy**

J. Phys. Chem. C, 113, 2256-2262 (2009)

Electron Transfer Kinetics of Cytochrome C in the Submillisecond Time Regime Using Time-Resolved Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy

J. Phys. Chem. C, 113, 2256-2262 (2009)

Electron Transfer Kinetics of Cytochrome C in the Submillisecond Time Regime Using Time-Resolved Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy

J. Phys. Chem. C, 113, 2256-2262 (2009)

Electron Transfer Kinetics of Cytochrome C in the Submillisecond Time Regime Using Time-Resolved Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy

J. Phys. Chem. C, 113, 2256-2262 (2009)

**Cytochrome C as a benchmark system for a two-layer gold surface with improved
surface-enhancement for spectro-electrochemistry**

Spectroscopy 24, 173-176 (2010)

Cytochrome C as a benchmark system for a two-layer gold surface with improved surface-enhancement for spectro-electrochemistry

Specroscopy 24, 173-176 (2010)

**Cytochrome C as a benchmark system for a two-layer gold surface with improved
surface-enhancement for spectro-electrochemistry**

Spectroscopy 24, 173-176 (2010)

Cytochrome C as a benchmark system for a two-layer gold surface with improved surface-enhancement for spectro-electrochemistry

Spectroscopy 24, 173-176 (2010)

Oriented immobilization and electron transfer to the cytochrome c oxidase

J. Solid State Electrochem. (2010)

Oriented immobilization and electron transfer to the cytochrome c oxidase

J. Solid State Electrochem. (2010)

Oriented immobilization and electron transfer to the cytochrome c oxidase

J. Solid State Electrochem. (2010)

Oriented immobilization and electron transfer to the cytochrome c oxidase

J. Solid State Electrochem. (2010)

Oriented immobilization and electron transfer to the cytochrome c oxidase

J. Solid State Electrochem. (2010)

Oriented immobilization and electron transfer to the cytochrome c oxidase

J. Solid State Electrochem. (2010)

Oriented immobilization and electron transfer to the cytochrome c oxidase

J. Solid State Electrochem. (2010)

Oriented immobilization and electron transfer to the cytochrome c oxidase

J. Solid State Electrochem. (2010)

Oriented immobilization and electron transfer to the cytochrome c oxidase

J. Solid State Electrochem. (2010)

Oriented immobilization and electron transfer to the cytochrome c oxidase

J. Solid State Electrochem. (2010)

**Molecular Hysteresis and Conformational Transitions of Cytochrome c Oxidase: Varying
the Redox State by Electronic Wiring**

Soft Matter (in press)

Molecular Hysteresis and Conformational Transitions of Cytochrome c Oxidase: Varying the Redox State by Electronic Wiring

Soft Matter (in press)

Molecular Hysteresis and Conformational Transitions of Cytochrome c Oxidase: Varying the Redox State by Electronic Wiring

Soft Matter (in press)

Molecular Hysteresis and Conformational Transitions of Cytochrome c Oxidase: Varying the Redox State by Electronic Wiring

Soft Matter (in press)

Molecular Hysteresis and Conformational Transitions of Cytochrome c Oxidase: Varying the Redox State by Electronic Wiring

Soft Matter (in press)

Molecular Hysteresis and Conformational Transitions of Cytochrome c Oxidase: Varying the Redox State by Electronic Wiring

Soft Matter (in press)

Molecular Hysteresis and Conformational Transitions of Cytochrome c Oxidase: Varying the Redox State by Electronic Wiring

Soft Matter (in press)

Molecular Hysteresis and Conformational Transitions of Cytochrome c Oxidase: Varying the Redox State by Electronic Wiring

Soft Matter (in press)

Molecular Hysteresis and Conformational Transitions of Cytochrome c Oxidase: Varying the Redox State by Electronic Wiring

Soft Matter (in press)

Molecular Hysteresis and Conformational Transitions of Cytochrome c Oxidase: Varying the Redox State by Electronic Wiring

Soft Matter (in press)

Molecular Hysteresis and Conformational Transitions of Cytochrome c Oxidase: Varying the Redox State by Electronic Wiring

Soft Matter (in press)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

**2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c
Oxidase induced by direct electron transfer**

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

**2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c
Oxidase induced by direct electron transfer**

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer

Biochemistry (under Review)

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Modeling Direct Electron Transfer to a Multi-Redox Center Protein: Cytochrome c
Oxidase**

J. Electroanalyt. Chem

**Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron
Transfer into Cytochrome c Oxidase**

submitted to Biophys. Journal

**Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron
Transfer into Cytochrome c Oxidase**

submitted to Biophys. Journal

**Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron
Transfer into Cytochrome c Oxidase**

submitted to Biophys. Journal

**Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron
Transfer into Cytochrome c Oxidase**

submitted to Biophys. Journal

**Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron
Transfer into Cytochrome c Oxidase**

submitted to Biophys. Journal

**Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron
Transfer into Cytochrome c Oxidase**

submitted to Biophys. Journal

**Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron
Transfer into Cytochrome c Oxidase**

submitted to Biophys. Journal

**Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron
Transfer into Cytochrome c Oxidase**

submitted to Biophys. Journal

**Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron
Transfer into Cytochrome c Oxidase**

submitted to Biophys. Journal

**Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron
Transfer into Cytochrome c Oxidase**

submitted to Biophys. Journal

**Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron
Transfer into Cytochrome c Oxidase**

submitted to Biophys. Journal

**Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron
Transfer into Cytochrome c Oxidase**

submitted to Biophys. Journal

**Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron
Transfer into Cytochrome c Oxidase**

submitted to Biophys. Journal

**Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron
Transfer into Cytochrome c Oxidase**

submitted to Biophys. Journal

**Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron
Transfer into Cytochrome c Oxidase**

submitted to Biophys. Journal

**Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron
Transfer into Cytochrome c Oxidase**

submitted to Biophys. Journal

**Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron
Transfer into Cytochrome c Oxidase**

submitted to Biophys. Journal

Kapitel 9

Zusammenfassung

Die optische Eigenschaften sowie der Oberflächenverstärkungseffekt von rauen Metalloberflächen sowie Nanopartikeln wurden intensiv für den infraroten Bereich des Spektrums in der Literatur diskutiert^{125, 126}. Simulationen des elektromagnetischen Verstärkungseffekts ergaben bisher übereinstimmend, dass dieser Effekt ausschließlich an Nanopartikeln oder an rauen Metalloberflächen zu beobachten ist¹²⁷. Solche Simulationen konnten auch deutlich zeigen, dass der Verstärkungseffekt im Infraroten auch von der Form der jeweiligen Partikel abhängt. Eine weitere wichtige Rolle für den Oberflächenverstärkungseffekt spielen auch die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Metallpartikeln. Dieser Befund deckt sich mit den Beobachtungen, dass dicht gepackte Metallfilme, bei denen sich die Nanopartikel gerade nicht berühren den größten Verstärkungseffekt zeigen¹²⁷. Für die Präparation solcher Oberflächen gibt es prinzipiell zwei verschiedene Strategien, zum einen können die Nanopartikel zuerst ex-situ synthetisiert werden, hierzu gibt es eine unglaublich große Anzahl an Synthesevorschriften in der Literatur. Nach dieser ex-situ Synthese müssen dann die Partikel auf der Oberfläche immobilisiert werden. Der zweite Ansatz beruht darauf, dass die Nanopartikel in-situ hergestellt und aufgewachsen werden. Hierbei wurden beide Ansätze ausgetestet, dabei stellte sich heraus, dass man nur mittels der in-situ Synthese der Goldnanopartikel in der Lage ist nanostrukturierte Oberflächen zu erhalten, welche elektrosch leitfähig sind, nicht zu rau sind, um eine Membranbildung zu ermöglichen und gleichzeitig einen optimalen Oberflächenverstärkungseffekt zeigen.

Obwohl keine ideale Form der Nanopartikel mittels der in-situ Synthese erhalten werden können, verhalten sich diese dennoch entsprechend der Theorie des Oberflächenverstärkungseffekts. Optimierungen der Form und Grösse der Nanopartikel führten in dieser Arbeit zu einer Optimierung des Verstärkungseffekts. Solche optimierten Oberflächen konnten einfach reproduziert werden und zeichnen sich durch eine hohe Stabilität aus.

Der so erhaltene Oberflächenverstärkungseffekt beträgt absolut 128 verglichen mit dem belagten ATR-Kristall ohne Nanopartikel oder etwa 6 mal, verglichen mit der Oberfläche, die bis jetzt auch in unserer Gruppe verwendet wurde. Daher können nun Spektren erhalten werden, welche ein deutlich besseres Signal zu Rauschverhältnis (SNR) aufweisen, was die Auswertung und Bearbeitung der erhaltenen Spektren deutlich vereinfacht und verkürzt.

Wie schon erwähnt, wurde neben dem Oberflächenverstärkungseffekt auch die Stabilität der neuen nanostrukturierten Metalloberfläche optimiert. Mit dieser Oberfläche ist es nun auch

möglich, spektroelektrochemische Langzeitmessungen zu realisieren, welche sich auch über mehrere Tage erstrecken können. Durch die optimierte Stabilität der Oberfläche ist man in der Lage deutlich mehr Messungen in einem gleichen Zeitraum zu realisieren und zugleich den „Ausschuss“ der Proben deutlich zu verringern.

Durch potentiometrische Titration des Referenzsystem Cytochrom C, absorbiert auf der Goldoberfläche, erhält man sigmoide Abhängigkeiten der Absorbanz in Abhängigkeit (A) vom angelegten Potential (E). Es konnte gezeigt werden, dass die Steigung von $\log(A)$ vs. E davon abhängt, ob eine Konformationsänderung auf Grund eines Redoxprozesses stattfindet oder nicht. Dies konnte anhand der Amid I Bande bei 1692cm^{-1} gezeigt werden. Diese Bande wird u.a. durch das Histidin 18 (His-18) hervorgerufen, welches senkrecht mit dem Porphyrin-Ring des Häm c koordiniert ist. Diese so erhaltenen sigmoiden Kurven konnten bezüglich des Midpoint-Potentials (E_m) und der Steigung ψ analysiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass das spektroskopisch erhaltene Redoxpotential sehr gut mit dem elektrochemisch erhaltenen Redoxpotential welches auch aus der Literatur bekannt ist übereinstimmt.

Eine grössere Steilheit der sigmoiden Kurve erhält man, wenn die funktionellen Gruppen, welche eine Bande im IR-Spektrum erzeugen, nicht beteiligt sind oder sehr weit von dem Ort entfernt sind, an dem der Elektronentransfer stattfindet. Dies konnte u.a. anhand der Bande 1552 cm^{-1} gezeigt werden, welche eine Amid II β -turn Typ III-Bande ist. Die hier beschriebenen β -turns sind einige Nanometer von dem Redoxzentrum des Cytochrom C entfernt, somit ist dieser Teil des Proteins nicht direkt am Elektronentransfer beteiligt.

Außer der potentiometrischen Titration des Cytochrom C wurden auch zeitaufgelöste Infrarot Messungen durchgeführt. Durch Auftragung der Absorbanz gegen die Zeitintervalle der zeitaufgelösten Messungen wurden eine exponentiell aufsteigende Kurve (oxidativer Teil) und eine exponentiell abfallende Kurve (reduktiver Teil) erhalten. Durch das Anfitten einer in [] beschriebenen monoexponentiellen Funktion konnten kinetische Konstanten für die Oxidation und Reduktion des Cytochrom C erhalten werden. Die kinetischen Konstanten, waren dabei vergleichbar mit denen aus der Elektrochemie erhaltenen. Durch Verwendung der PSD wurde die Auflösung und das Signal zu Rausch Verhältnis nochmals verbessert.

Nach der Optimierung der verwendeten Metalloberfläche und der verwendeten Messparameter am Beispiel von Cytochrom C wurde nun an der Oberflächenbelegung der deutlich größeren Cytochrom c Oxidase gearbeitet. Hierfür wurde zunächst der DTNTA-Linker ex-situ synthetisiert. Anschließend wurden gemischte Monolagen (self assembled

monolayers) aus DTNTA und DTP hergestellt. Die NTA-Funktionalität ist für die Anbindung der CcO mit der his-tag Technologie verantwortlich. Durch Mischen der Komponenten kann man die optimale Linkerkonzentration auf der Oberfläche einstellen. Die Kriterien für eine optimale Linkerkonzentration waren die elektrischen Parameter der Schicht vor und nach Rekonstitution in eine Lipidmembran, sowie Elektronentransferraten bestimmt durch elektrochemische Messungen. Es stellte sich heraus, auch im Zusammenhang mit SEIRA-Spektren, dass das Protein in einem etwas größeren Abstand immobilisiert ist als beim in-situ DTNTA. Der größere Abstand zur Oberfläche, verleiht dem immobilisierten Protein eine größere Flexibilität. Es stellte sich heraus, dass die erhaltenen Elektronentransferraten sehr empfindlich auf die Oberflächenverdünnung und die hinzugewonnenen Flexibilität ansprechen. Gleichzeitig war das Signal zu Rauschverhältnis der Proteinkonzentration auf der Oberfläche nach wie vor sehr gut. Mittels Elektrochemie wurden Elektronentransferraten gemessen, welche in der gleichen Größenordnung lagen, wie Elektronentransferraten welche man von ähnlichen Redoxproteinen aus der Literatur kennt. Hierbei stellte sich heraus, dass die Packungsdichte ein entscheidender Parameter für die Funktionsfähigkeit eines Membran-Proteins ist. Die Stabilisierung durch die Lipidmembran spielt dabei eine wichtige Rolle. Das so aufgebaute System wurde neben der CcO auch auf andere Proteine angewandt, welche mit einem Histidin-Anker funktionalisiert waren. So konnte eine Immobilisierung des Proteins und eine Membranbildung bei OR5 (Odorant-Rezeptor 5) von Prof. Eva Sinner, dem Ionenkanal ICl_{n159} von Prof. Markus Paulmichl, sowie dem bc1-Komplex (Q-Cytochrom c Oxidoreduktase) von Prof. Robert B. Gennis gezeigt werden.

Erst mit diesem optimierten System, welches zuverlässig und reproduzierbar funktioniert, konnten weitere Messungen an der CcO begonnen werden.

Aus elektrochemischen Messungen war bekannt, dass die CcO durch direkten Elektronentransfer unter Sauerstoffsättigung in einen aktivierten Zustand überführt werden kann. Dieser aktivierte Zustand zeichnet sich durch eine Verschiebung der Redoxpotentiale um etwa 400mV gegenüber dem aus Gleichgewichts-Titrations bekannten Redoxpotential aus. Durch SEIRAS konnte festgestellt werden, dass die Reduktion bzw. Oxidation aller Redoxzentren tatsächlich bei den in der Cyclovoltammetrie gemessenen Potentialen erfolgt. Außerdem ergaben die SEIRA-Spektren, dass durch direkten Elektronentransfer gravierende Konformationsänderungen innerhalb des Proteins stattfinden.

Bisher war man davon ausgegangen, aufgrund des Elektronentransfers mittels Mediatoren, dass nur minimale Konformationsänderungen beteiligt sind. Vor allem konnte erstmalig

der aktivierte und nicht aktivierte Zustand der Cytochrom c Oxidase spektroskopisch nachweisen werden.

Deshalb sind wir davon überzeugt, dass der direkte Elektronentransfer ein besseres Abbild des Elektronentransfers mittels des natürlichen Substrates der CcO, Cytochrom c ist, als derjenige mit Mediatoren. Daraus leiten wir eine grössere Relevanz unserer Befunde für das Enzym ab, als die der bisher bekannten Untersuchungen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden auch Titrations mit einem „Mediatoren-Cocktail“ durchgeführt.

Ein weiterer Vorteil der elektrochemischen Anregung besteht darin, dass man den Redoxvorgang in beiden Richtungen verfolgen kann (ox. \rightarrow red. oder red. \rightarrow ox.). Wenn das System zu jeder Zeit einen Gleichgewichtszustand erreicht, sollte die sigmoide Abhängigkeit $A=f(E)$ von der Richtung unabhängig sein.

Im Fall des direkten Elektronentransfer waren die sigmoiden Kurven gegeneinander verschoben, d.h. sie bilden eine Hystereseschleife.

In früheren Arbeiten konnten Hysterese anhand von Säure-Base Titrations von Polyelektrolyten beobachtet werden. Diese dort erhaltenen Hysterese wurden als Zeichen für kooperative Wechselwirkung innerhalb des verwendeten Polyelektrolyts interpretiert. Kooperative Prozesse spielen bei dynamischen Prozessen, wie Proteinfaltungen, eine wichtige Rolle. Da der direkte Elektronentransfer innerhalb des ptBLM-Systems es uns erlaubt Elektronen über den natürlichen Elektronenpfad von Cu_A über die beiden Häme bis hin zum Cu_B zu transportieren, kann es sein, dass kooperative Prozesse auch eine wichtige Rolle beim Transport der Elektronen und Protonen durch die CcO spielen. Diese wichtigen Informationen über den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion von Redoxproteinen konnte ausschließlich mittels direktem Elektronentransfer gezeigt werden. Solche Zusammenhänge können mittels Gleichgewichtstitrations unter Verwendung von Mediatoren nicht gezeigt werden.

Spektren der potentiometrischen Titrations hatten sehr starke Änderungen im Amid I Bereich ergeben. In diesem Bereich gibt es viele überlappende Banden. Um diese besser auflösen zu können wurden die 2D IR Spektroskopie sowie die Phasensensitive Detektion (PSD) eingeführt. Es stellte sich heraus, dass mit diesen Analyse-Techniken eine Fülle weiterer Informationen bezüglich der Konformationsänderungen erhalten werden kann. Neben der besseren spektralen Auflösung der einzelnen Banden konnten auch hydrophile und

hydrophobe Bereiche des Proteins deutlich voneinander unterschieden werden. So konnte mit Hilfe der 2D Spektroskopie deutliche Unterschiede im Verhältnis von hydrophilem und hydrophobem Anteil in der aktivierten und nicht aktivierten Oxidase sichtbar gemacht werden. Neben diesen Unterschieden konnten auch zahlreichere kooperativen Wechselwirkungen der einzelnen Aminosäuregruppen in der aktiven Form ausgemacht werden, während in der nicht aktiven Form der CcO nur sehr wenige Aminosäure Gruppen in Abhängigkeit voneinander das elektrische Übergangsdipolmoment ändern. Diese Unterschiede konnten besonders deutlich anhand der Amid I Region des analysierten Proteins gezeigt werden, auf eine massive Umfaltung des Proteins hindeutet.

Die Methode der 2D-IR-Spektroskopie war auch von großer Bedeutung die für zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie (tr-SEIRAS). Diese Technik kombiniert mit der PSD ermöglichte die Zuordnung der Banden in den sehr komplexen Spektren. Dabei stellte sich heraus, dass nur im Fall der **aktivierten** CcO regelmäßige Unterschiede zu erkennen waren.

Simulationen (electron-transfer-model) in Kooperation mit Herrn Prof. Walz (Biozentrum Basel) konnten kinetische Konstanten für die Redoxprozesse der einzelnen Redoxzentren der CcO erhalten werden. Hierbei ermöglichten die verwendeten Simulationen das Abtrennen der elektrischen Aufladeprozesse der Metalloberfläche von den kinetischen Konstanten für die Redox-Übergänge der Redoxzentren des Proteins.

Neben den zeitaufgelösten Messungen unter anaeroben Bedingungen wurden auch zeitaufgelöste Messungen unter aeroben Bedingungen durchgeführt, d.h. das Enzym konnte in-situ unter turnover Bedingungen beobachtet werden. Abhängig von der Sauerstoffkonzentration wurde beobachtet, dass das Protein schneller Elektronen transferieren kann, des Weiteren konnten erst unter aeroben Bedingungen auch Banden der Aminosäuren gezeigt werden, welche an den Protonenkanälen (D- und K-Kanal) beteiligt sind.

Die vollständige Analyse der signifikanten Änderungen der IR Spektren in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration wird die Aufgabe einer weiteren Doktorarbeit sein.

Anhang

Proteinogene Aminosäuren

Aminosäure	3-Letter-Code	1-Letter-Code
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

Zuordnung von IR-Banden zur Oxidoreduktion der einzelnen Redoxzentren der CcO von *Paracoccus denitrificans* (up-Konfiguration)

Bandenlage / cm ⁻¹	Redoxzentrum	Redoxzustand	Zuordnung der Bande (Absorber; Schwingung; zugeordnete Seitenkette)
3092	Cu _B	ox	OH, OH ⁻ ; ν(OH); Cu _B , OH ⁻ Ligand / Y; ν(OH); Y280 / H; ν(NH); H326, H325 / (CH) Alkene; ν(C=H); H326, H325, H276 W272, Y280
2876	Cu _B	ox	OH, OH ⁻ ; ν(OH); Cu _B , OH ⁻ Ligand / Y; ν(OH); Y280 / H; ν(NH); H326, H325 / (CH) Alkane, ν(CH); beliebiger Ligand / H ₃ O ⁺ ; ν _{as} (OH); H ⁺ x (H ₂ O) _n , n=5
1746/1737	Häm a	ox/red	E, Glu-COOH; ν(C=O); E278
1689	Cu _A	ox	Amid I, β-Faltblatt; ν(C=O)
1684	Cu _A	red	Amid I, β-Faltblatt; ν(C=O)
1674	Häm a ₃ komplexe Bande	ox	R, Arg-H ₅ ⁺ ; ν _{as} (CN ₃ H ₅ ⁺); R473 / Propionat; ν(C=O) / Formyl / Amid I, Windungen; ν(C=O)
1661	Häm a	red	Amid I, α-Helix; ν(C=O) / Amid I, Windungen; ν(C=O)
1655	Häm a ₃	ox	Amid I, α-Helix; ν(C=O)
1651	Cu _A	red	Amid I, α-Helix; ν(C=O)
1641	Häm a ₃	ox	Formyl; ν(C=O) / 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 / Formyl / Amid I, β-Faltblatt; ν(C=O)
1618	Häm a ₃	red	Y, Tyr-OH; ν(CC) Ring, δ(CH); Y280 / W; ν(CC), ν(C=C); W272, W164 / Vinyl; ν(C-C) Amid I, β-Faltblatt; ν(C=O)

Zuordnung von IR-Banden zur Oxidoreduktion der einzelnen Redoxzentren der CcO

Bandenlage / cm ⁻¹	Redoxzentrum	Redoxzustand	Zuordnung der Bande (Absorber; Schwingung; zugeordnete Seitenkette)
1603	Cu _A	red	Amid I, β-Faltblatt; ν(C=O)
1592	Cu _A	ox	H, HisH; ν(C=C); H224, H181 / R, Arg-H ₅ ⁺ ; ν _{as} (CN ₃ H ₅ ⁺); R473 / D, Asp-COO ⁻ ; ν _{as} (COO ⁻); D178
1561	Häm a ₃	ox	W, Trp-NH; ν(CC), δ(CH); W164 Propionat
1546	Häm a	red	Häm, ν _{38y}
1537	Häm a	ox	Propionat
1526	Häm a ₃	red	Propionat / Häm; ν _{38s} / Häm; ν _{38y}
1510	Cu _A	red	W, Trp-NH; ν(CN), δ(CH), δ(NH); W121
1489	Cu _B	red	W; ν(CC), δ(CH); W272 H, HisH; ν(C=N), δ(CH); H325, H326
1483	Cu _B	ox	W, Trp-NH; ν(CC), δ(CH); W272
1473	Häm a ₃	red	F, δ _{as} (CH ₃); F412 / Häm; A _{1g} ; ν ₃
1468	Cu _A	ox	W, Trp-NH; δ(CH), ν(CC), ν(CN); W121
1455	Cu _B	ox	H, His ⁻ ; H326, H325, H276
1445		ox	Y
1431	Cu _A	red	W, Trp-NH; δ(CH), ν(CC), ν(CN); W121 / D, Asp-COOH; δ(COH); D178 / E, Glu-COO ⁻ ; ν _s (COO ⁻); E218
1419	Cu _A	red	W, Trp-NH; δ(NH), ν(CC), ν(CH); W121 / H, HisH; ν(CN), δ(NH); δ _s (CH _x); H181, H224 / D, Asp-COOH; δ(COH); D178
1407	Cu _A	red	E, Glu-COO ⁻ ; ν _s (COO ⁻); E218 / D, Asp-COO ⁻ ; ν _s (COO ⁻); D178 / W, Trp-NH; ν(CC), δ(NH), δ(CH); W121

Anhang IR-Bandenzuordnung (up-Konfiguration)

Bandenlage / cm ⁻¹	Redoxzentrum	Redoxzustand	Zuordnung der Bande (Absorber; Schwingung; zugeordnete Seitenkette)
1389	Häm a ₃	ox	T, δ(COH); δ(CH); T50 / E, γ _w (CH ₂); E278 / Propionat
1354	Häm a ₃	red	W; ν(CC), ν(CN), δ(CH); W164, W272 / Y; γ _w (CH ₂); Y280 / A _{1g} ; ν ₄
1332	Cu _B	ox	W; γ _w (CH ₂); W272 / Y, Tyr-O ⁻ ; γ _w (CH ₂); Y280 / D, Asp-COOH; δ(COH); D399 / T; δ(COH), δ(CH); T344
1321	Cu _B	red	W; δ(CH); W272 / Y; δ(CH ₂) (Endgruppe), ν(CC), δ(CH); Y280 / T; δ(COH), δ(CH); T344 / D, Asp-COOH; δ(COH); D399
1308	Cu _B	ox	D, Asp-COOH; δ(COH); D399 / W; ν(CC); W272 / T; δ(COH), δ(CH); T344 / H, HisH; ν(C=N), ν(CN); H326, H325
1250	Cu _B	red	W; ν(CC), δ(CH), γ(CH ₂) (Endgruppe); W272 / T; δ(COH), δ(CH); T344
1151	Häm a	red	E, Glu-COOH; ν(CO); E278 / H, His; ν(CN), δ(NH); H94, H413
1128	Cu _B	red	D, Asp-COOH; ν(CO); D399 / W, Trp-NH; ν(CC), δ(CH); W272 / T; ν(CO); T344
1105	Cu _B	ox	H; ν(CN), δ(CH); H326, H325, H276 / Y; γ(CH ₂) (Endgruppe); Y280
1032	Cu _B	ox	H ₂ O; H ⁺ -Oszillation; H ⁺ x (H ₂ O) _n , n=2,6

Glossar

- AFM: Atomic Force Microscopy (Rasterkraftmikroskopie)
- ADP: Adenosindiphosphat
- ATP: Adenosintri-phosphat
- ATR: Attenuated total Reflection (abgeschwächte Totalreflexion)
- ANTA: Amino-nitrilotriacetic Acid (Amino-Nitrilotriessigsäure) bzw. N_{α} ; N_{α} -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
(Fouriertransformierte 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 (Quecksilber- Cadmium-Tellurid-Detektor)
- NADH: Nicotinamidadenindinukleotid
- 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-Absorptionsspektroskopie)
- 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)
- SHE: Standard Hydrogen Electrode (Standardwasserstoffelektrode)
- 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)

Material & Geräte

- Aufdampfanlage: fl 400 mit auto 306 [Edwards]
- Blaspistole: Elektra Beckum BP 200 [Metabo]
- Chopper: 197 [EG&G]
- 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]
- Nanofocus: NanoFocus $\mu surf$ confocal microscope kombiniert mit 100x Objektiv [Nanoscope]
- Oszilloskop: LC334AM 500 MHz [Le Croy]
- pH-Meter: pH-Meter 766 Calimatic [Knick]
- Polarisator [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 SCANGEN-Modul für analoge Potenzial-Scans [Eco Chemie, B.V.]
- Rasterkraftmikroskop: AFM (Atomic Force Microscope) Dimension 3100 [Veeco]
- Reagenzglasschüttler: Reax 2000 [Heidolph]
- Ultraschallbad: Super RK510 H [Sonorex]
- Zweikreisgoniometer [Huber]

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]
- DPTL: 2,3-Di-O-phytanoyl-sn-glycerin-1-tetraethylenglycol-D,L- α -liponsäureester [Synthese im MPI für Polymerforschung]
- DTP: Dithiopropionat ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4\text{S}_2$) [Sigma]
- DTSP: Dithiosuccinimidylpropionat ($\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_8\text{S}_2$) [Sigma]
- Essigsäure ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) [Fluka]
- Fluorwasserstoffsäure (HF) 40% [Sigma]
- Glucose Oxidase: Type VII von *Aspergillus niger* (Schwarzschimmel) [Sigma]
- Glucose: D-(+)-Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) [Sigma]
- Gold: Feingoldgranulat 99,99% [ESG Edelmetall Service GmbH & Co. KG]
- Goldchlorid (AuCl_3) 99,9999% [Sigma]
- Kaliumchlorid (KCl) [Sigma]
- Kaliumcarbonat (K_2CO_3) [Sigma]
- Kaliumhydroxid (KOH) 85% [WTL Laborbedarf]
- Kaliumphosphat (K_2HPO_4) [Fluka]
- Katalase (Rinderleber) [Sigma]
- Natriumchloroaurat ($\text{Na}(\text{AuCl}_4)$) [Sigma]
- Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) [Fluka]
- Natriumsulfit (Na_2SO_2)
- Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) [Sigma]

- Nickel(II)-chlorid Hexahydrat ($\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) [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]

Weitere Materialien

- Argon mit Reinheitsgrad 6.0 [Westfalen AG, 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]
- Poliertücher (TexMet P, VerduTex, MicroCloth) [Buehler]
- Prisma LaSFN-9 mit Brechungsindex $n=1,845$ [Spindler&Hoyer]
- Sauerstoff mit Reinheitsgrad 6.0 [Air Liquide, Frankfurt/Main]
- Siliziumwafer-Spezialanfertigung [CrysTec GmbH]
- Teflon [Cadillac Plastic's]

Literaturverzeichnis

1. D. A. Harris, 1995.
2. P. Rich, *Nature*, 2003, **421**.
3. C.W. Hoganson, M.A. Pressler, D.A. Proshlyakov and G.T. Babcock, *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1365**, 170-174.
4. B. Kadenbach, *Angew Chem*, 1983, **95**, 273-281.
5. D. Heitbrink, in *Forschungszentrum Jülich*, Jülich, 2002.
6. O. E. J. Deisenhofer, K. Miki, R. Huber and H. Michel, *Nature*, 1985, **318**, 618-624.
7. B.Sackmann and E. Neher, *Spektrum der Wissenschaft*, 1992, **5**.
8. H.M. Lee, T.K. Das, D.L. Rousseau, D. Mills, S. Ferguson Miller, R.B. Gennis, *Biochemistry*, 2000, **39**, 2989-2996.
9. M.I.Verkhovskiy, A. Jasaitis M.L.Verkhovskaya, J.E.Morgan and M.Wikström, *Nature*, 1999, **6743**, 480-483.
10. R. Coronado, *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 1986, **15**, 259-277.
11. E.Sackmann, *Science*, 1996, **504**, 1-28.
12. G.Krishna, J. Schulte, B.A. Cornell, R.J.Pace and P.D. Osman, *Langmuir*, 2003, **19**, 2294-2305.
13. R.Naumann, E.K. Schmidt, A.Jonczyk, K.Fendler, B.Kadenbach, A.Offenhäuser and W.Knoll, *Biosensors and Bioelectronic*, 1999, **14**, 651-662.
14. R.Naumann, S.M. Schiller, F.Giess, B.Grohe, K.B.Hartman, I.Kärcher, I.Koeper, J.Lubben, K.Vasilev and W.Knoll, *Langmuir*, 2003, **19**, 5435-5443.
15. W.Knoll, C.W. Frank, C.Heibel, R.Naumann, A.Offenhäuser, J.Ruhe, E.K.Schmidt, W.W.Shen and A.Sinner, *Reviews in Molecular Biotechnology*, 2000, **74**, 134-158.
16. F. Giess et al., *Biophys J*, 2004, **87**, 3213-3220.
17. K. Ataka and J. Heberle, *Journal of the American Chemical Society*, 2004, **126**, 9445-9457.
18. M. G. Friedrich, V. U. Kirste, J. Zhu, R. B. Gennis, W. Knoll and R. L. Naumann, *J Phys Chem B*, 2008, **112**, 3193-3201.
19. M. G. Friedrich, J. W. Robertson, D. Walz, W. Knoll and R. L. Naumann, *Biophys J*, 2008, **94**, 3698-3705.
20. M. Wikström, *Nature*, 1977, **266**, 271-273.
21. M. Wikström, J.E. Morgan, *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 10266-10273.
22. M.I. Verkhovskiy, J.E. Morgan, M. Wikström, *Biochemistry (Mosc)*, 1995, **34**, 7483-7491.
23. Proshlyakov D.A., Ogura T., Shinzawa-Itoh K., Yoshikawa S. and K. T., *Biochemistry*, 1996, **35**, 8580-8586.
24. Proshlyakov D.A., Ogura T., Shinzawa-Itoh K., Yoshikawa S. and K. T., *Biochemistry*, 1996, **35**, 76-82.
25. Behr J., Hellwig P., Mäntele W. and M. H., *Biochemistry*, 1998, **37**, 7400-7406.
26. P.Hellwig, J. Behr, C.Ostermeier, O.M.H.Richter, U.Pfützner, A.Odenwald, B.Ludwig, H.Michel, W.Mäntele, *Biochemistry*, 1998, **37**, 7390-7399.
27. Hellwig P. , Grzybek S. , Behr J. , Ludwig B. , Michel H. and M. W., *Biochemistry*, 1999, **38**, 1685-1694.
28. J. Behr, P. Hellwig, W. Mentele, H. Michel, *Biochemistry*, 1998, **37**, 7400-7406.
29. M. G. Friedrich, M. A. Plum, M. G. Santonicola, V. U. Kirste, W. Knoll, B. Ludwig and R. L. Naumann, *Biophys J*, 2008, **95**, 1500-1510.
30. V. U. Kirste, Max-Planck Institut für Polymerforschung, Mainz, 2007.
31. J.R. Winkler, B.G. Malmström, H.B. Gray, *Biophysical Chemistry*, 1995, **54**, 199-209.
32. M. Osawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 1997, **70**, 2861-2880.

33. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 2003.
34. S. Roy Caplan, I.R. Miller and Giulio Milazzo, *Bioelectrochemistry: general introduction*, Birkhauser, Basel, Boston, 1994.
35. T. Takano, O.B. Kallai, R. Swanson, R.E. Dickerson, *J. Biol. Chem.*, 1973, **248**, 5234-5255.
36. R.E. Dickerson, T. Takano, D. Eisenberg, O.B. Kallai, L. Samson, A. Cooper, E. Margoliash, *J. Biol. Chem.*, 1971, **246**, 1511-1535.
37. G.W. Bushnell, G.V. Louie, G.D. Brayer, *Journal of Molecular Biology*, 1990, **214**, 585-595.
38. R. A. Scott. and A. G. Mauk, *Cytochrome c: A Multidisciplinary Approach*, University Science Books, Sausalito, 1996.
39. G. W. Pettigrew and G. R. Moore, *Cytochromes c: Biological Aspects*, Springer Verlag, Berlin, 1987.
40. D.M. Mitchell, R.B. Gennis, *FEBS Letters*, 1995, **368**, 148-150.
41. E. M. Svensson, J. Abramson, G. Larsson, S. Tornroth, P. Brzezinski, S. Iwata, *Journal of Molecular Biology*, 2002, **321**, 329-339.
42. www.pdb.com, PDB-Protein-Databank.
43. S. Fergusson-Miller, G.T. Babcock, *Cemical Reviews*, 1996, **96**, 2889-2907.
44. T. Kitawaga, T. Ogura, *Progr. Inorg. Chem*, 1997, **45**, 431-479.
45. H. Michel, J. Behr, A. Harrenga, A. Kannt, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 1998, **27**, 329-356.
46. R. Mitchell, P.R. Rich, *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, **1186**, 19-26.
47. A.A. Konstantinov, S. Siletsky, D. Mitchell, A. Kaulen, R.B. Gennis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, **94**, 9085-9090.
48. T.V. Vygodina, C. Pecoraro, D. Mitchell, R.B. Gennis, A.A. Konstantinov, *Biochemistry* 1998, **37**, 3053-3061.
49. D. Zaslavsky, R.B. Gennis, *Biochemistry*, 1998, **37**, 3062-3067.
50. K. Budiman, in *Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie*, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main, 2006.
51. F. MacMillan, A. Kannt, J. Behr, T. Prisner, H. Michel, *Biochemistry*, 1999, **38**, 9179-9184.
52. D. Proshlyakov, M.A. Pressler, C. DeMaso, J.F. Leykam, D.L. DeWitt, G.T. Babcock, *Science*, 2000, **290**, 1588-1591.
53. M. Oliveberg, P. Brzezinski, B.G. Mahnstrom, *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, **977**, 322-328.
54. J.E. Morgan, M. Verkhovskiy, M. Wikström, *Biochemistry*, 1996, **35**, 12235-12240.
55. P. Adelroth, M. Karpefors, G. Gilderson, F.L. Tomoso, R.B. Gennis, P. Brzezinski, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, **1459**, 533-539.
56. D.A. Proshlyakov, T. Ogura, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, E.H. Appelman, T. Kitagawa, *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 29385-29388.
57. D.A. Proshlyakov, T. Ogura, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Kitagawa, *Biochemistry*, 1996, **35**, 8580-8586.
58. D.A. Proshlyakov, T. Ogura, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Kitagawa, *Biochemistry*, 1996, **35**, 76-82.
59. M. Wikström, H.T. Saari, *Biochimica and Biophysica Acta*, 1977, **462**, 347-361.
60. M. Wikström, *Nature*, 1989, **338**, 776-778.
61. H. Michel, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, **95**, 12819-12824.
62. M. Ruitenber, A. Kannt, E. Bamberg, B. Ludwig, H. Michel, K. Fendler, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, **97**, 4632-4636.
63. M. Wikström, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, **1458**, 188-198.

64. J. Fetter, J. Qian, J. Shapleigh, J.W. Thomas, A. Garcia-Horsman, E. Schmidt, J. Hosler, G.T. Babcock, R.B. Gennis, S. Ferguson-Miller, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, **92**, 1604-1608.
65. J. Fetter, M. Sharpe, J. Qian, D. Mills, S. Ferguson-Miller, P. Nicholls, *Febs Lett*, 1996, **393**, 155-160.
66. J.P. Hosler, S. Ferguson-Miller, M.W. Calhoun, J.W. Thomas, J. Hill, L. Lemieux, J. Ma, C. Georgiou, J. Fetter, J. Shapleigh, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1993, **25**, 121-136.
67. I. Hofacker, K. Schulten, *Proteins*, 1998, **30**, 100-107.
68. T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yosikawa, *Science*, 1996, **272**, 1136-1144.
69. S. Riistama, G. Hummer, A. Puustinen, R.B. Dyer, W.H. Woodruff, M. Wikström, *Febs Lett*, 1997, **414**, 275-280.
70. A. Puustinen, M. Wikström, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, **96**, 35-37.
71. U. Pfitzner, A. Odenwald, T. Ostermann, L. Weingard, B. Ludwig, O.M.H. Richter, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1998, **30**, 89-97.
72. K. Ataka, F. Giess, W. Knoll, R. Naumann, S. Haber-Pohlmeier, B. Richter and J. Heberle, *Journal of the American Chemical Society*, 2004, **126**, 16199-16206.
73. M. Ruitenberg, Universität Frankfurt, Frankfurt am Main, 2001.
74. E. Hochuli, H. Döbeli, A. Schacher, *Journal of Chromatography*, 1987, **411**, 177-184.
75. D. Schach, in *Fachbereich für Physik, Mathematik und Informatik*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, 2009.
76. H. Günzler, H.M. Heise, *IR-Spektroskopie-Eine Einführung*, VCH, Weinheim, 1996.
77. M. Buskühl, in *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I*, Humboldt-Universität Berlin, Berlin, 2003.
78. P. R. Griffiths, *Chemical Infrared Fourier Transform Spectroscopy*, John Wiley & Sons, New York, 1975.
79. J. Heberle, K. Ataka, *Biospektrum*, 2004, **10**, 42-44.
80. S. Krimm, J. Bandekar, *Adv. Protein Chem.*, 1986, **38**, 181-364.
81. J. Jakes, S. Krimm, *Spectrochimica Acta Part A*, 1971, **27**, 19-34.
82. J. Jakes, S. Krimm, *Spectrochimica Acta Part A*, 1971, **27**, 35-63.
83. S. Krimm, J. Bandekar, *Biopolymers*, 1983, **22**, 217-225.
84. H.Susi, Dekker, New York, 1969.
85. S. Krimm, *Biopolymers*, 1983, **22**, 217-225.
86. B. Stuart, *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*, John Wiley & Sons, 1997.
87. K.J. Kauppinen, M. Douglas, H.H. Mantsch, D.G. Cameron, *Appl.Spec.*, 1981, **35**, 255-334.
88. W.P. Aue, E. Bartholdi, R.R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, 1976, **64**, 2229.
89. I. Noda, *Appl.Spec.*, 1990, **44**, 550-561.
90. J. Fahrenfort, *Spectrochimica Acta* 1961, **17**, 698.
91. N. J. Harrick, *J. Phys. Chem.*, 1960, **64**, 1110.
92. C. Gerthsen, H. Vogel, Springer-Verlag, 1997.
93. A.Newton, *2nd ed. Book III*.
94. F.L. Pedrotti, L.s. Pedotti, *Optik eine Einführung*, Prentice Hall Verlag, 1996.
95. N. J. Harrick, *Opt. Soc. Amer.*, 1965, 851.
96. N. J. Harrick, *Internal Reflection Spectroscopy*, John Wiley & Sons, 1979.
97. L. Bergmann, C. Schaefer, *Lehrbuch der Experimentalphysik, Band 3, Optik*, 1993.
98. F. M. Mirabella. Jr., *Appl.Spec.*, 1985, **21**, 45.
99. F. Goos, H. Hänchen, 1947, **1**, 333.
100. M. Fülleborn, Universität-Gesamthochschule Essen, Essen, 2002.
101. A.Hartstein, J.R. Kirtley, J.C.Tsang, *Phys. Rev. Lett.*, 1980, **45**, 201-204.
102. V.P. Tolstoy, I.V. Chernyshova, V.A. Skrysiievsky, *Springer*, 2003.

103. Z. Zhang, T. Imae, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2001, **233**, 99-106.
104. M. Osawa, K. Ataka, *Surface Science*, 1992, **262**.
105. F. Meng, Universität Heidelberg, Heidelberg, 2007.
106. D. Baurecht, *Technical report*, 1997.
107. D. Baurecht, U.P. Fringeli, *Review of Scientific Instruments*, 2001, **72**, 3782-3792.
108. W. Mäntele, *Kluwer Academic*, 1996.
109. B. O. Seraphim, 1973.
110. U. P. Fringeli, *Internal Reflection Spectroscopy, Theory and Applications*, Marcel Dekker, New York, 1992.
111. U.P. Fringeli, H.H. Günthard, D. Baurecht, *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*, Marcel Dekker, New York, 2000.
112. D. F. Baurecht, U. P., *Review of Scientific Instruments*, 2001, **72**.
113. U. P. Fringeli, 1997.
114. D. Baurecht, W. Neuhäuser, U.P. Fringeli, *AIP Conference Proceedings*, 1996, **430**, 367.
115. M.Müller, R. Buchet, U.P. Fringeli, *Journal of Physical Chemistry*, 1996, **100**, 10810.
116. J. Allen, L.R.F. Bard, *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, New York, 2001.
117. P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, Wiley VCH, 2001.
118. N. Magonov, M. Whangbo, *Surface Analyses with STM and AFM*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1998.
119. R. Wiesendanger, *Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy*, Cambridge University Press, 1996.
120. R. Wiesendanger, *Scanning Probe Microscopy*, Springer Verlag, Berlin, 1998.
121. W. Brown, *Dynamic Light Scattering, The Method and some Applications*, Clarendon Press, Oxford, 1993.
122. C. Nowak, in *Physikalische Chemie*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, 2007.
123. W. Schärtl, *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*, Springer-Verlag, Berlin, 2007.
124. M. M. Hesse, H.; Zeeh, B., *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, 2005.
125. P. Brzezinsky and R. Gennis, *J Bioenerg Biomembr*, 2008, 521-531.
126. H. Aoyama, K. Muramoto, K. Shinzawa-Itoh, K. Hirata, E. Yamashita, T. Tsukihara, T. Ogura and S. Yoshikawa, *P Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**, 2165-2169.
127. J. Koepke, E. Olkhova, H. Angerer, H. Muller, G. H. Peng and H. Michel, *Bba-Bioenergetics*, 2009, **1787**, 635-645.
128. L. Qin, J. Liu, D. A. Mills, D. A. Proshlyakov, C. Hiser and S. Ferguson-Miller, *Biochemistry-Us*, 2009, **48**, 5121-5130.
129. F. Schotte, M. H. Lim, T. A. Jackson, A. V. Smirnov, J. Soman, J. S. Olson, G. N. Phillips, M. Wulff and P. A. Anfirud, *Science*, 2003, **300**, 1944-1947.
130. K. Gerwert, *Curr Opin Struc Biol*, 1993, **3**, 769-773.
131. A. Trivella, T. Gaillard, R. H. Stote and P. Hellwig, *J Chem Phys*, 2010, **132**, -.
132. R. Hielscher, T. Wenz, C. Hunte and P. Hellwig, *Bba-Bioenergetics*, 2009, **1787**, 617-625.
133. E. A. Gorbikova, K. Vuorilehto, M. Wikstrom and M. I. Verkhovsky, *Biochemistry-Us*, 2006, **45**, 5641-5649.
134. P. Hellwig, S. Grzybek, J. Behr, B. Ludwig, H. Michel and W. Mantele, *Biochemistry-Us*, 1999, **38**, 1685-1694.
135. P. Hellwig, C. Ostermeier, H. Michel, B. Ludwig and W. Mantele, *Bba-Bioenergetics*, 1998, **1409**, 107-112.

136. M. Iwaki, J. Breton and P. R. Rich, *Bba-Bioenergetics*, 2002, **1555**, 116-121.
137. M. Iwaki, A. Puustinen, M. Wikstrom and P. R. Rich, *Biochemistry-Us*, 2006, **45**, 10873-10885.
138. M. G. Friedrich, J. W. F. Robertson, D. Walz, W. Knoll and R. L. C. Naumann, *Biophys J*, 2008, **94**, 3698-3705.
139. C. Nowak, M. G. Santonicola, D. Schach, J. Zhu, R. B. Gennis, D. Baurecht, D. Walz, W. Knoll and R. L. C. Naumann, *Soft Matter*, **submitted**
140. C. Nowak, D. Schach, J. Gebert, M. Grosserueschkamp, R. B. Gennis, S. Ferguson-Miller, D. Walz, W. Knoll and R. L. C. Naumann, *J. Solid State Electrochemistry*, 2009, **in press**.
141. I. Noda, *Appl Spectrosc*, 1990, **44**, 550-561.
142. I. Noda and Y. Ozaki, *Two-Dimensional Correlation Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2004.
143. Filosa A., Wang Y., Ismail A.A. and E. A.M., *Biochemistry*, 2001, **40**, 8256-8263.
144. M. A. Czarnicki, *Applied Spectroscopy*, 1998, **52**, 1583-1590.
145. C. Nowak, R. B. Gennis, S. Ferguson-Miller, D. Walz, W. Knoll and R. L. C. Naumann, *Soft Matter*, **submitted**.
146. C. Nowak, *Applied Spectroscopy* 2009, **63**, 1068-1074.
147. D. M. Mitchell and R. B. Gennis, *Febs Lett*, 1995, **368**, 148-150.
148. M. Iwaki, A. Puustinen, M. Wikstrom and P. R. Rich, *Bba-Bioenergetics*, 2006, 180-181.
149. I. Noda, A. E. Dowrey and C. Marcott, *Appl Spectrosc*, 1993, **47**, 1317-1323.
150. T. Lefevre, K. Arseneault and M. Pezolet, *Biopolymers*, 2004, **73**, 705-715.
151. M. J. Paquet, M. Laviolette, M. Pezolet and M. Auger, *Biophys J*, 2001, **81**, 305-312.
152. M. Svensson-Ek, J. Abramson, G. Larsson, S. Tornroth, P. Brzezinski and S. Iwata, *J Mol Biol*, 2002, **321**, 329-339.
153. M. Wikstrom, A. Bogachev, M. Finel, J. E. Morgan, A. Puustinen, M. Raitio, M. Verkhovskaya and M. I. Verkhovskiy, *Bba-Bioenergetics*, 1994, **1187**, 106-111.
154. P. Hellwig, A. Boehm, U. Pfitzner, W. Maentele and B. Ludwig, *Bba-Bioenergetics*, 2008, **1777**, 220-226.
155. Y. F. Song, E. Michonova-Alexova and M. R. Gunner, *Biochemistry-Us*, 2006, **45**, 7959-7975.
156. J. Behr, H. Michel, W. Mantele and P. Hellwig, *Biochemistry-Us*, 2000, **39**, 1356-1363.
157. P. Hellwig, B. Rost, U. Kaiser, C. Ostermeier, H. Michel and W. Mantele, *Febs Lett*, 1996, **385**, 53-57.
158. J. Heberle, R. M. Nyquist, D. Heitbrink, C. Bolwien and R. B. Gennis, *Bba-Bioenergetics*, 2004, **1658**, 25-25.
159. R. B. Gennis, *Febs Lett*, 2003, **555**, 2-7.
160. A. Barth, *Progress in biophysics and molecular biology* 2000, **74**, 141-173.
161. A. Filosa, Y. Wang, A. Ismail and A. M. English, *Biochemistry-Us*, 2001, **40**, 8256-8263.
162. K. Murayama, Y. Q. Wu, B. Czarnik-Matuszewicz and Y. Ozaki, *J Phys Chem B*, 2001, **105**, 4763-4769.
163. F. MacMillan, K. Budiman, H. Angerer and H. Michel, *Febs Lett*, 2006, **580**, 1345-1349.
164. R. Gennis, *Frontiers in Bioscience*, 2004, 581-591.
165. R. M. Nyquist, D. Heitbrink, C. Bolwien, R. B. Gennis and J. Heberle, *P Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**, 8715-8720.
166. P. Brzezinski and R. Gennis, *J Bionerg Biomembr*, 2008, 521-531.

167. D. Schach, M. Grosserueschkamp, C. Nowak, R. B. Gennis, S. Ferguson-Miller, W. Knoll, D. Walz and R. L. C. Naumann, *J. Electroanal. Chem.*, 2009, **submitted**.
168. A. K. Udit and H. B. Gray, *Biochem Bioph Res Co*, 2005, **338**, 470-476.
169. A. K. Udit, N. Hindoyan, M. G. Hill, F. H. Arnold and H. B. Gray, *Inorg Chem*, 2005, **44**, 4109-4111.
170. Z. Zheng and A. R. Gunner, *Proteins*, 2009, **75**, 719-734.
171. A. Katchalsky and R. Spanger, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 1968, **I**, 127-175.
172. C. Kolano, J. Helbing, M. Kozinski, W. Sander and P. Hamm, *Nature*, 2006, **444**, 469-472.
173. P. Hellwig, J. Behr, C. Ostermeier, O. M. H. Richter, U. Pfitzner, A. Odenwald, B. Ludwig, H. Michel and W. Mantele, *Biochemistry-Us*, 1998, **37**, 7390-7399.
174. F. A. Armstrong, *Russ J Electrochem+*, 2002, **38**, 49-62.
175. F. A. Armstrong, *J. Chem Soc., Dalton Trans.*, 2002, 661-671

176. L. J. C. Jeuken, A. K. Jones, S. K. Chapman, G. Cecchini and F. A. Armstrong, *J Am Chem Soc*, 2002, **124**, 5702-5713.
177. F. Baymann, N. L. Barlow, C. Aubert, B. Schoepp-Cothenet, G. Leroy and F. A. Armstrong, *Febs Lett*, 2003, **539**, 91-94.
178. F. Lisdat, R. Dronov, H. Mohwald, F. W. Scheller and D. G. Kurth, *Chem Commun*, 2009, 274-283.
179. I. Willner, Y. M. Yan, B. Willner and R. Tel-Vered, *Fuel Cells*, 2009, **9**, 7-24.
180. C. Leger, S. J. Elliott, K. R. Hoke, L. J. C. Jeuken, A. K. Jones and F. A. Armstrong, *Biochemistry-Us*, 2003, **42**, 8653-8662.
181. A. S. Haas, D. L. Pilloud, K. S. Reddy, G. T. Babcock, C. C. Moser, J. K. Blasie and P. L. Dutton, *J Phys Chem B*, 2001, **105**, 11351-11362.
182. K. A. Vincent, A. Parkin and F. A. Armstrong, *Chem Rev*, 2007, **107**, 4366-4413.
183. E. Laviron, *Electroanal Chem*, 1982, **12**, 53-157.
184. E. Laviron, *J. Electroanal. Chem.*, 1979, **101**, 19-28.
185. J. N. Butt, Armstrong, F. A. , *Voltammetry of Adsorbed Redox Enzymes: Mechanisms in the Potential Dimension*, Springer, 2008.
186. V. Fourmond, K. Hoke, H. A. Heering, C. Baffert, F. Leroux, P. Bertrand and C. Leger, *Bioelectrochemistry*, 2009, **76**, 141-147.
187. M. Wikstrom, *Bba-Bioenergetics*, 2004, **1655**, 241-247.
188. F. Giess, M. G. Friedrich, J. Heberle, R. L. Naumann and W. Knoll, *Biophys J*, 2004, **87**, 3213-3220.
189. C. Nowak, D. Schach, J. Gebert, D. Walz, W. Knoll and R. L. C. Naumann, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2010.
190. D. M. Mitchell and R. B. Gennis, *Febs Lett*, 1995, **368**, 148-150.
191. R. Naumann, S. M. Schiller, F. Giess, B. Grohe, K. B. Hartman, I. Karcher, I. Koper, J. Lubben, K. Vasilev and W. Knoll, *Langmuir*, 2003, **19**, 5435-5443.
192. T. L. Hill, *Free Energy Transduction in Biology*, Acad. Press, New York, 1977.
193. D. Walz, S. R. Caplan, D. R. L. Scriven and D. Mikulecky, *Bioelectrochemistry: General Introduction*, Birkhäuser, Basel 1995.
194. J. W. Robertson, M. G. Friedrich, A. Kibrom, W. Knoll, R. L. C. Naumann and D. Walz, *J Phys Chem B*, 2008, **112**, 10475-10482.
195. J. E. A. McIntosh and R. P. McIntosh, *Mathematical Modelling and Computers in Endocrinology*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1980.
196. C. Nowak, M. G. Santonicola, D. Schach, J. Zhu, R. B. Gennis, S. Ferguson-Miller, D. Baurecht, D. Walz, W. Knoll and R. L. C. Naumann, *Soft Matter*, submitted.
197. A. K. Udit, M. G. Hill and H. B. Gray, *Langmuir*, 2006, **22**, 10854-10857.

198. A. K. Udit, K. D. Hagen, P. J. Goldman, A. Star, J. M. Gillan, H. B. Gray and M. G. Hill, *J Am Chem Soc*, 2006, **128**, 10320-10325.
199. C. Nowak, T. Laredo, J. Lipkowski, R. B. Gennis, S. Ferguson-Miller, W. Knoll and R. L. C. Naumann, *to be submitted Biophys J*, 2010.
200. F. A. Armstrong, R. Camba, H. A. Heering, J. Hirst, L. J. C. Jeuken, A. K. Jones, C. Leger and J. P. McEvoy, *Faraday Discuss*, 2000, 191-203.
201. Nowak, C.; Lüning, C.; Knoll, W.; Naumann, R.L.C., *Appl Spectroscopy* 2009, **63**, 1068-1074.
202. C. Nowak, C. Luening, D. Schach, D. Baurecht, W. Knoll and R. L. C. Naumann, *J Phys Chem C*, 2009, **113**, 2256-2262.
203. M. G. Friedrich, F. Giess, R. Naumann, W. Knoll, K. Ataka, J. Heberle, J. Hrabakova, D. H. Murgida and P. Hildebrandt, *Chem Commun*, 2004, 2376-2377.
204. Nowak, C.; Lüning, C.; Schach, D.; Knoll, W.; Naumann, R.L.C., *J Phys Chem (C)*, 2009, **113**, 2256-2262.
205. J. K. Kauppinen, D. J. Moffatt, H. H. Mantsch and D. G. Cameron, *P Soc Photo-Opt Inst*, 1981, **289**, 260-262.
206. J. O. Alben and F. G. Fiamingo, *Biophys J*, 1984, **45**, A369-A369.
207. M. Osawa, ed. J. M. G. Chalmers, P.R., Eds, John Wiley and Sons: Chichester, U.K., 2002, pp. 785-799.
208. A. Pucci, *Physica Status Solidi B Basic Research*, 2005, **242**, 2704.
209. R. Aroca, *Surface Enhanced Vibrational Spectroscopy*, Wiley, 2006.

Curriculum Vitae

Christoph Nowak

Address

Watfordstrasse 12b

55122 Mainz

Germany

Phone: +496131/4986096

Mail: nowakc@mpip-mainz.mpg.de

Personal details

born 2nd June 1980, Pirmasens, Germany

nationality german

Academic education

Jan. 2008 - Jul. 2010: PhD with excellence (summa cum laude) at Max-Planck-Institute for Polymer Research (MPI-P), Mainz, Germany with Dr. R. L. C. Naumann and Prof. W. Knoll.

“Spectroelectrochemical Investigations using Surface-enhanced Infrared-Spectroscopy of Multi-Redox-Center-Proteins in a biomimetic membrane system”

Mar. 2007 - Nov. 2007: Diploma thesis at Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany with Dr. W. Schärtl and Prof. M. Schmidt

"Oriented Diffusion of Nanotracers in thermoresponsive Hydrogels"

Oct. 2005 - Apr. 2006: Erasmus exchange student at CNRS laboratory for macromolecular chemistry, Lille, and Institute for medical technology (ThIAIS), Lille, France

"Etude de la diffusion par Imagerie par Résonance Magnétique dans des gels à base de poly (alcool vinylique) modifié"

Oct. 2002 - Jan. 2007: Undergraduate and Graduate studies at Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

Research internships

Mar. 2010: University of Vienna, Austria

May - Jun. 2009: University of Vienna, Austria

Apr. 2009: University of Guelph, Canada

Jun. 2008: University of Vienna, Austria

Scholarship and awards

Feb. 2010: Student Research Achievement Award (SRAA) of Biophysical Society

Oct. 2005 - Apr. 2006: Erasmus scholarship

Schools and conferences

May 2010: Joint Workshop on Bionanotechnology, School of Materials Science and Engineering, Singapore

Apr. 2010: BIT's 3rd Annual World Congress of Industrial Biotechnology ibio-2010, Shanghai, China

Apr. 2010: ETH Bioplasmonics Conference, Ascona, Switzerland

Feb. 2010: Biophysical Society 54th Annual Meeting, San Francisco, USA
BioNano Workshop, Hirschegg, Austria

Workshop on Advanced Biospecific Interaction Analysis, Singapore

Aug. 2009: XIII European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Palermo, Italy

BioNano Workshop, Hirschegg, Austria

Jul. 2009: 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Nagoya, Japan

Feb. 2009: Biophysical Society 53rd Annual Meeting, Boston, USA

Apr. 2008: Biomaterials at the MPIP, Naurod, Germany

Publications

- C. Nowak, T. Laredo, J. Lipkowski, R. B. Gennis, S. Ferguson-Miller, W. Knoll, R. L. C. Naumann, 2D-SEIRA spectroscopy to highlight Conformational Changes of the Cytochrome c Oxidase induced by direct electron transfer, submitted to Biochemistry, 2010
- C. Nowak, D. Schach, V. U. Kirste, J. Zhu, R. B. Gennis, D. Baurecht, D. Walz, W. Knoll, R. L. C. Naumann, Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron Transfer into Cytochrome c Oxidase, submitted to Biophysical Journal, 2010
- C. Nowak, R. B. Gennis, S. Ferguson-Miller, D. Walz, W. Knoll, R. L. C. Naumann, Molecular Hysteresis and Redox Transitions of Cytochrome c Oxidase, submitted to Soft Matter 2010
- C. Nowak, M. G. Santonicola, D. Schach, J. Zhu, R. B. Gennis, D. Baurecht, D. Walz, W. Knoll, R. L. C. Naumann, Conformational Changes of Cytochrome c Oxidase: Varying the Redox State by Electronic Wiring, submitted to Soft Matter 2010
- C. Nowak, D. Schach, J. Gebert, M. Grosserueschkamp, R. B. Gennis, S. Ferguson-Miller, W. Knoll, D. Walz, R. L. C. Naumann, Oriented immobilization and electron transfer to the cytochrome c oxidase, Journal of Solid State Electrochemistry, 2010
- M. Grosserueschkamp, C. Nowak, W. Knoll, R. L. C. Naumann, Time-Resolved Surface-Enhanced Resonance Raman Spectro-Electrochemistry of Heme Proteins, Spectroscopy, 24, 2010
- C. Nowak, D. Schach, M. Grosserueschkamp, W. Knoll, R. L. C. Naumann, Cytochrome C as a benchmark system for a two-layer gold surface with improved surface-enhancement for spectro-electrochemistry, Spectroscopy, 24, 2010
- C. Nowak, C. Luening, W. Knoll, R. L. C. Naumann, A Two-Layer Gold Surface with Improved Surface Enhancement for Spectro-Electrochemistry Using surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy, Applied Spectroscopy, 63, 2009
- M. Grosserueschkamp, C. Nowak, D. Schach, W. Schaertl, W. Knoll, R. L. C. Naumann, Silver Surfaces with Optimized Surface Enhancement by Self-Assembly of Silver Nanoparticles for Spectroelectrochemical Applications, Journal of Physical Chemistry C, 113, 2009
- C. Nowak, C. Luening, D. Schach, D. Baurecht, W. Knoll, R. L. C. Naumann, Electron Transfer Kinetics of Cytochrome C in the Submillisecond Time Regime Using Time-Resolved surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy, Journal of Physical Chemistry C, 113, 2009

M. Schwägler, C. Nowak, J. Hoffmann, W. Schärtl, Enhanced Gold Nanoparticle Mobility in Thermoresponsive Hydrogels Caused by Light-to-Heat Conversion- A Facile to Optically Controlled Release at Low Laser Power, Journal of Physical Chemistry C, 113, 2009

A. Grimm, C. Nowak, J. Hoffmann, W. Schärtl, Electrophoretic Mobility of Gold Nanoparticles in Thermoresponsive Hydrogels, Macromolecules, 42, 2009