



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie von Redoxproteinen
in einem biomimetischen Membransystem“

verfasst von

Christoph Steininger, BSc.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 863

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Masterstudium Biologische Chemie

Betreut von:

Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. Wolfgang Kautek



Diese Arbeit wurde am Austrian Institute of Technology (AIT) in Wien zwischen Juni 2012 und Februar 2013 angefertigt.

„It’s not what you don’t know that gets you into trouble.

It’s what you know for sure that just ain’t so.“

- Mark Twain -

Diese Arbeit ist meinen Eltern und meinen Geschwistern gewidmet, die mich stetig bei meiner Ausbildung unterstützten.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Die Atmungskette	3
1.2. Die Cytochrom c Oxidase.....	4
1.2.1. Aufbau und Funktionsweise	4
1.2.2. L-Kanal und D-Kanal (O ₂ und Wasseraustrittskanal)	7
1.2.3. Katalytischer Zyklus	8
1.2.4. Die Cytochrom c Oxidase in der protein-tethered Bilayer Lipid Membrane ...	10
1.2.5. Vier-Elektronenübertragungsmodell	12
1.2.6. Bisherige spektroskopische Untersuchungen an Cytochrom c Oxidase	14
1.3. Infrarotspektroskopie	16
1.3.1. Molekülschwingungen	16
1.3.2. Infrarotspektroskopie an Proteinen	19
1.3.3. FTIR-Spektroskopie	22
1.3.4. ATR-FTIR-Spektroskopie	24
1.3.5. Zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie.....	26
1.3.6. Oberflächenverstärkte Infrarot-Absorbanz-Spektroskopie (SEIRAS)	28
1.3.7. Modulierte Anregung	29
1.3.8. Phasensensitive Detektion	30
1.4. Cyclovoltammetrie.....	31
2. Materialien und Methoden.....	34
2.1. Probenpräparation.....	34
2.2. Immobilisation von Cytochrom c Oxidase und Bildung der künstlichen Lipidmembran.....	34
2.3. Aktivierung der CcO mittels Cyclovoltammetrie	35
2.4. Elektrochemisch-modulierte tr-ATR-SEIRAS.....	35
3. Ergebnisse und Diskussion	38

3.1. Immobilisierung und Aktivierung der CcO.....	38
3.1.1. CcO Anbindung unter SEIRAS-Beobachtung	38
3.1.2. Membranbildung	39
3.1.3. Aktivierung der Cytochrom c Oxidase.....	39
3.1.4. Conclusio von 3.1.....	40
3.2. Anaerobe EC modulierte Step Scan Messung	41
3.2.1. Optimierung der Packungsdichte.....	41
3.2.2. Optimierung der Anregungsfrequenz.....	42
3.2.3. Auftrennung der Amid I Bande	44
3.2.4. Fingerprintbereich	50
3.2.5. Auswertung der Daten.....	52
3.2.6. Conclusio von 3.2.....	55
3.3. Vorschau: Aerobe EC modulierte Step Scan Messung	57
3.3.1. Vergleich von anaerober und aerober Messung	57
3.3.2. Einfluss der Halbperiodenlänge auf die Messung	59
3.3.3. Conclusio von 3.3.....	61
4. Conclusio.....	62
5. Anhang.....	64
5.1. Chemikalien und Lösungen	64
5.2. Messinstrumente	66
5.3. Curriculum Vitae	67
6. Literaturverzeichnis.....	68
7. Abstract	73

1. Einleitung

Transmembranproteine werden durch 20-30% des Genoms codiert und haben ein großes Aufgabenspektrum in der Zelle. Zu den Funktionen gehören der Transport von Ionen oder Molekülen durch die Zellmembran, Bindung von Signalmolekülen zur Signaltransduktion und die Energieumwandlung durch Redoxproteine. Aufgrund der Diversität der Funktionen der Proteine, sind sie meist Targets für pharmazeutische Produkte. Das zeigt sich vor allem dadurch, dass etwa 60% aller auf dem Markt befindlichen Medikamente auf Transmembranproteine wirken.

Frühen Organismen war es möglich mittels Glykolyse und anschließender Fermentation zu Ethanol oder Lactat 2 Mol ATP (Adenosintriphosphat) pro Mol Glucose zu erhalten. Die Entwicklung der Atmungskette revolutionierte den Energiehaushalt der Zellen. Durch vollständige Oxidation von Glucose zu CO_2 und Reduktion von O_2 können ca. 32 ATP-Moleküle pro Umsatz synthetisiert werden [1]. Diese Energie kann unter anderem dazu genutzt werden, um multizelluläre Organismen und Spezialisierungen einzelner Zellen zu ermöglichen. Bakterien mit respiratorischen Proteinen hatten daher einen evolutionären Vorteil. Entsprechend der Endosymbiontentheorie wurden respiratorische Bakterien von anderen durch Phagocytose aufgenommen. Statt einer Verdauung wurden diese Zellen im Innermembranraum belassen und entwickelten sich später zu Mitochondrien. Dadurch konnten Zellen, die keine Gene der Atmungskette besaßen, von diesen Organellen profitieren und es kam zu einer Symbiose, welche bis heute erhalten ist. Dabei haben sich die Mitochondrien praktisch nur mehr auf die Energieversorgung spezialisiert. Eukaryotische Zellen sind auf die Atmungskette angewiesen, da ohne diese nicht ausreichend Energie für die Funktionen in der Zelle zur Verfügung gestellt werden kann. Somit hat die Evolution einen eleganten Weg gefunden um Zucker, Fettsäuren und Proteine vollständig zu oxidieren, und dabei möglichst viel Energie daraus zu gewinnen, wobei die Produktion toxischer Nebenprodukte vermieden wird. Höhere Lebensformen wären ohne diese Symbiose nicht möglich [2, 3].

Die Atmungskette besteht aus verschiedenen Proteinen, welche eine Elektronentransportkette bilden. Einer der wichtigsten Proteinkomplexe ist die Cytochrom c Oxidase. Sie ist von eminenter Bedeutung, da sie als letztes respiratorische Enzym die Reduktion von O_2 zu H_2O katalysiert. Dieses Protein ist Gegenstand der vorliegenden Masterarbeit.

1.1. Die Atmungskette

Peter Mitchell untersuchte die Mitochondrien als Kraftwerke der Zellen und stellte die Theorie über die Kopplung zwischen der ATP-Synthese und dem Elektronentransfer auf [4]. 1978 erhielt er für seine Arbeit über die Energieumwandlung von Zellen über einen Protonengradienten den Nobelpreis. In der Folge wurde im Verlauf der letzten 50 Jahre eine intensive Forschung zum Verständnis der Atmungskette betrieben welche von so eminenter Bedeutung für das Leben ist.

Die Atmungskette ist eine der wichtigsten Energiequellen der Zelle. Sie kommt in allen Eukaryoten und vielen aeroben Prokaryoten vor. In eukaryotischen Zellen befindet sich die Atmungskette in der inneren mitochondrialen Membran. Ihre Substrate erhält sie direkt aus dem Citratzyklus, welcher ebenfalls in den Mitochondrien abläuft. Bei Prokaryoten befindet sich die Atmungskette in der Zellmembran. Die Atmungskette besteht aus vier respiratorischen Enzymkomplexen und einem Komplex zur Produktion von ATP.

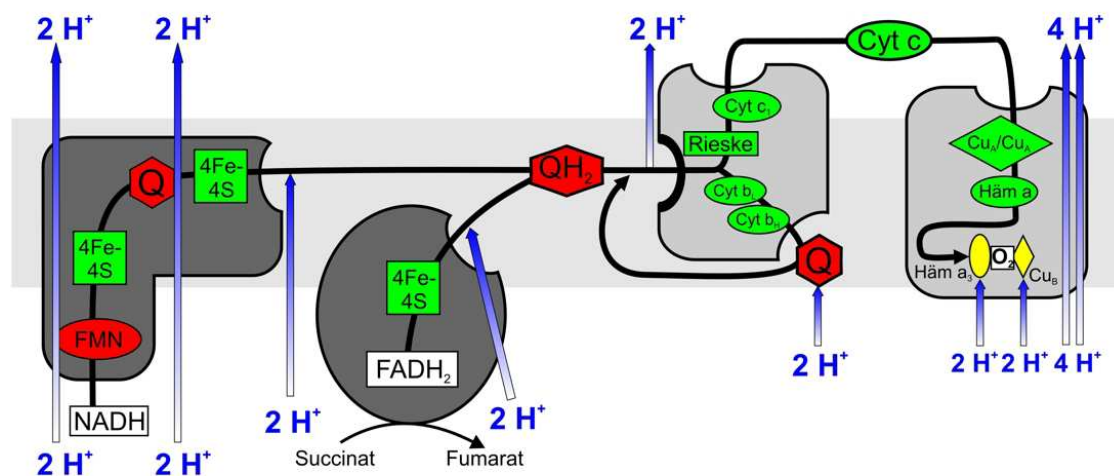


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Atmungskette. Die 4 respiratorischen Komplexe werden von links nach rechts dargestellt. (Bildquelle: Wikipedia: Atmungskette)

Im Verlauf des Citratzyklus werden durch Elektronenübertragung pro Mol Acetyl-CoA drei Mol Nicotinamidadenindinucleotid (NADH) und ein Mol Flavinadenindinucleotid (FADH₂) generiert. Diese sind, wie Ubichinon und Cytochrom c, Elektronencarrier.

NADH wandert zur inneren Mitochondrienmembran und überträgt seine 2 Elektronen auf das Flavinmononucleotid (FMN) der NADH-Dehydrogenase (Komplex I). Dieses Redoxprotein gehört zu den Eisen-Schwefel-Proteinen, da es neben FMN auch 3 Fe-S-Cluster (Eisen-Schwefel Cluster) enthält, über welche die Elektronen transportiert werden. Die beiden Elektronen werden mit zwei Protonen auf Ubichinon (oder Coenzym Q) übertragen. Während des Transports findet eine Translokation von 4 Protonen von der Matrix in den Intermembranraum statt.

Der zweite Komplex ist der Succinat-Q-Reduktase-Komplex (Komplex II). In diesem Enzymkomplex ist das FAD als Cofaktor gebunden. Dieser katalysiert die Reaktion von Succinat zu Fumarat, wobei zwei Elektronen auf FAD übertragen werden und zusammen mit 2 Protonen FADH_2 generiert wird. Die Elektronen werden über Fe-S-Cluster weiter auf Ubichinol übertragen. Die Succinat-Q-Reduktase ist der einzige Redoxkomplex der Atmungskette, der keine Protonen pumpt.

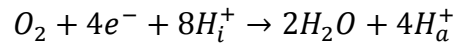
Das Ubichinon überträgt seine Elektronen auf die Q-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III). Dieser Enzymkomplex enthält sowohl 3 Häme als prosthetische Gruppen, als auch ein Fe-S-Zentrum. Die Elektronen werden je auf ein Cytochrom c übertragen. Während dieser Übertragung werden 2 Protonen gepumpt.

Das Cytochrom c überträgt die Elektronen weiter zum letzten respiratorischen Enzymkomplex: der Cytochrom c Oxidase.

1.2. Die Cytochrom c Oxidase

1.2.1. Aufbau und Funktionsweise

Die Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) ist der letzte protonenpumpe Enzymkomplex der Atmungskette. Diese Häm-Kupfer-Oxidase besitzt 2 Cu-Zentren und 2 Häme. Es erhält 4 Elektronen von Cytochrom c und nutzt diese zusammen mit 4 Protonen um O_2 zu $2 \text{H}_2\text{O}$ zu reduzieren. Die freiwerdende Energie wird genutzt um weitere 4 Protonen über die Membran zu pumpen. Die Gesamtreaktion wird in Glg. 1.1 beschrieben.



1.1

Die Cytochrom *c* Oxidase von *Rhodobacter sphaeroides* ist ein Membranprotein mit der molekularen Masse von 127.4 kDa. Sie besteht aus 4 Untereinheiten mit molekularen Massen von 63, 29, 30 und 5.4 kDa. *R. sphaeroides* ist ein fakultativ anaerobes, gram-negatives Bakterium, welches 2 Arten an CcO besitzt. Der aa₃-Typ wird bei hohem Sauerstoffgehalt exprimiert, der cbb₃-Typ während der Photosynthese [5]. In dieser Arbeit wird ausschließlich der aa₃-Typ verwendet.

- Untereinheit I: Besteht aus 12 Transmembranhelices und 3 Redoxzentren: Häm a, Häm a₃ und Cu_B [6]
- Untereinheit II: Besteht aus 3 Transmembranhelices und einem Cu_A-Zentrum [7]
- Untereinheit III: Besteht aus 7 Transmembranhelices und ist wichtig für die Funktion des Enzyms [8]
- Untereinheit IV: Besteht aus einer Transmembranhelix, die Funktion ist bis heute nicht geklärt [9]

Im Vergleich zur CcO von *R. sphaeroides* ist die CcO von Säugern ein Protein mit einer viel höheren molekularen Masse (500 kDa). Sie besteht aus 13 Untereinheiten und ist somit bedeutend komplexer [10]. Allerdings sind die Aminosäuresequenzen der Untereinheiten I und II mit dem katalytische Zentrum hochkonserviert, sodass Aufbau und Funktionsweise der beiden Arten von Enzymen vergleichbar sind [11, 12]. Die Größe der Säuger-CcO macht die Analyse der molekularen Vorgänge sehr schwer. Deshalb wird meist auf die CcO aus Bakterien (*R. sphaeroides* oder *P. denitrificans*) zurückgegriffen. Außerdem können genetische Veränderungen wie Punktmutationen oder Tags leichter in bakterielle Systeme eingefügt werden.

Das bei dieser Arbeit verwendete Enzym wurde in der Gruppe von Prof. Shelagh Ferguson-Miller der Michigan State University hergestellt. Dabei wurde der C-Terminus der Untereinheit II mit einem Histidin-Tag (His-Tag) modifiziert. Die His-Tag Technologie wurde ursprünglich für die Proteinaufreinigung genutzt. In unserem Fall ermöglicht sie die Bindung und Ausrichtung des Enzyms auf der mit Gold beschichteten Oberfläche eines ATR-Kristalls [13-15].

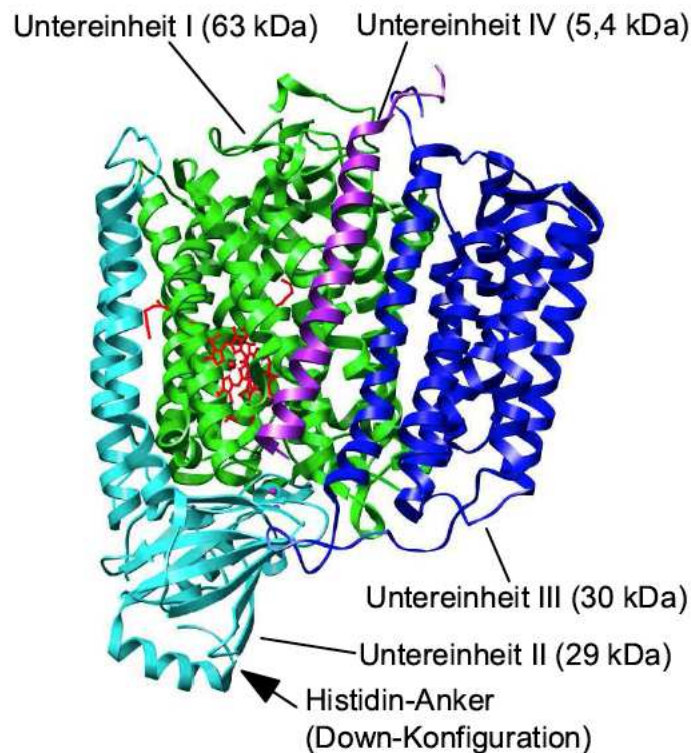


Abbildung 1.2: Röntgenstruktur von Cytochrom *c* Oxidase von *R. sphaeroides*, versehen mit einem His-Tag an Untereinheit II [16]

Die Cytochrom *c* Oxidase kann mindestens zwei Aktivitätszustände einnehmen. Einer wird als „resting- State“ und der andere der „pulsed State“ bezeichnet.

Der „resting State“ tritt ein wenn das Protein in der Gegenwart von Sauerstoff längere Zeit nicht durch Cytochrom *c* reduziert wird. Dieser Zustand existiert nur bei in isolierten Proteinen. In der lebenden Zelle wird das Protein permanent reduziert und ist somit im „pulsed State“. Dieser ist der Zustand, den das reduzierte Protein nach mehreren Sauerstoff-Pulsen annimmt. In diesem Zustand läuft das Protein quasi auf höchster Leistung [17]. Jedes Elektron von Cytochrom *c* wird sofort weitergeleitet und zur Reduktion von O_2 genutzt.

Das Protein besitzt 4 Redoxzentren, bestehend aus Cu_A , Häm *a*, Häm *a*₃ und Cu_B . Das Cu_A Zentrum besteht aus 2 Cu Atomen, welche durch Histidin- und Cysteinreste

komplexiert werden. Es übernimmt ein Elektron von Cytochrom *c* und überträgt es weiter zum Häm *a*. Von dort wird es weiter zum eigentlichen katalytischen Zentrum, auch binukleares Zentrum (BNC) genannt, geleitet, welches durch Häm *a*₃ und Cu_B gebildet wird. Zwischen Häm *a*₃ und Cu_B befindet sich die O₂ Bindungsstelle. Es werden 4 Elektronen und 4 Protonen benötigt um O₂ zu H₂O zu reduzieren. Während dieser Reaktion werden zusätzlich 4 Protonen über die Membran gepumpt.

1.2.2. L-Kanal und D-Kanal (O₂ und Wasseraustrittskanal)

Da das enzymatische Zentrum im Inneren des Enzyms liegt stellt sich die Frage wie die Protonen für die Reduktion von O₂ in das Enzym vordringen können. Dafür wurden 2 Kanäle gefunden, welche D- und L-Kanal genannt wurden [18]. Die Kanäle bestehen aus hochkonservierten Aminosäuren, welche in den meisten Häm-Kupferoxidasen vorkommen.

Der D-Kanal liegt unter den Häm *a*₃ und besteht aus protonierbaren Aminosäuren und H₂O-Molekülen. Der Name kommt von der Aminosäure Asp D132 (UE I) am Anfang des Kanals. Nach der O₂-Bindung wird der Kanal geöffnet und die Protonen über den Kanal gepumpt.

Der K-Kanal besteht aus protonierbaren Aminosäuren und 2 H₂O Molekülen, wobei Lysin K362 am Beginn des Kanals liegt und Häm *a* am Ende. Während der Reduktion am binuklearen Zentrum werden hier die Protonen transportiert um die negativen Ladungen zu kompensieren. Dabei werden die Protonen nicht von der wässrigen Umgebung sondern vom Häm *a* zum reaktiven Zentrum transportiert. Durch Konformationsänderungen kann der Kanal geschlossen werden und der D-Kanal wird geöffnet. Durch diesen Mechanismus kann ein Kurzschluss zwischen den beiden Kanälen verhindert werden [19, 20].

Mutationsstudien zeigen dass der Austausch von Aminosäuren am K-Kanal zwar einen Verlust an enzymatischer Aktivität zeigt, aber keinen Verlust der Pumpleistung. Daraus schließt man, dass der K-Kanal nur für den Protonentransport in das katalytische Zentrum verantwortlich ist [21]. Im Gegensatz dazu dürfte der D-Kanal neben dem Pumpen von Protonen zum BNC auch entscheidend für das

Protonenpumpen sein [22]. Wird die Glutaminsäure E101 in der Untereinheit II (UE II) durch ein Glutamin (D) ersetzt, ist es dem Protein nur mehr erschwert möglich, Protonen aufzunehmen und zu pumpen, sodass die Reduktion von Häm a_3 von 159 s^{-1} auf 5 s^{-1} verlangsamt wird. Diese Verlangsamung konnte nicht beim Austausch von Asparaginsäure D132 (UE1) durch Alanin beobachtet werden. Durch die Blockade des D-Kanals können Protonen nicht mehr in das Protein einwandern. Ein Proton aus dem Kanal wird von E286 in das BNC übertragen und stoppt die Reaktion im F-Intermediat [23].

Neben den Protonenkanälen wird auch ein O_2 -Eintrittskanal diskutiert. Hierfür gibt es mehrere Vorschläge. Hofacker et al. untersuchte hierfür die möglichen Routen mittels molekular dynamischer Rechnungen. Es konnte gezeigt werden, dass der Pathway über zwei hydrophobe Taschen verläuft, in der sich der O_2 sammeln kann. Von diesen Taschen kann das O_2 -Molekül über Kanäle zum binuklearen Zentrum weiterdiffundieren. Dazwischen befindet sich ein H_2O -Molekül, welches den Weg versperrt. Durch Konformationsänderungen kann dieses Molekül den Kanal freigeben und O_2 kann passieren [24].

Neben den Protonenaufnahmekanälen wurde auch lange die Existenz eines Wasserkanals für das entstandene Wasser diskutiert. Schmidt et al. zeigte, dass das redox-inaktive Mg^{2+} eine entscheidende Rolle am Wasseraustritt hat. Es erfolgt ein Austausch zwischen der Umgebungswasser und dem binuklearen Zentrum [25, 26].

1.2.3. Katalytischer Zyklus

Im Jahre 1977 beschrieb Wikström als erster das Pumpen von Protonen durch die Cytochrom *c* Oxidase. Im Anschluss daran wurden verschiedene Mechanismen diskutiert um das redoxgetriebene Pumpen zu beschreiben und die intramolekularen Reaktionen zu verstehen. Dennoch ist dieses Thema noch immer ein Gebiet intensiver Diskussion und Forschung. Besonders ist die Frage, wie das Pumpen der Protonen an den Elektronentransfer gekoppelt ist, noch nicht vollständig geklärt.

Die Reduktion von O_2 zu H_2O erfolgt zwischen dem Häm a_3 und dem Cu_B . Der Reaktionszyklus des Enzyms wird in verschiedene Zustände bzw. Intermediate

unterteilt und kann außerdem in zwei Teile getrennt werden. Im ersten Teil wird das Enzym mit Elektronen reduziert und im zweiten Teil wird das Enzym oxidiert und O_2 reduziert.

- O-Intermediat: Das vollständig oxidierte Enzym wird als O Intermediat oder C_2 bezeichnet.
- E-Intermediat: Die CcO nimmt ein Elektron von Cytochrom c auf, welches durch die Redoxzentren transferiert wird und Cu_B^{2+} zu Cu_B^{+1} reduziert. Ein H^+ erreicht das an das Cu_B angelagerte OH^- und H_2O wird abgespalten. Der Enzymzustand wird als E-Intermediat (bzw. C_1) bezeichnet.
- R-Intermediat: Ein weiteres e^- und Proton wird aufgenommen. H_2O wird abgespalten und Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert. Dieser Zustand wird als R-Intermediat (bzw. C_0) bezeichnet.
- A-Intermediat: O_2 diffundiert ans katalytische Zentrum, bindet axial an das Fe^{2+} von Häm a_3 und bildet so den Zustand A (C_{0A}).
- P_M -Intermediat: Es kommt zur Bildung des Oxoferryl-Zustandes, welcher als P_M Zustand (C_4) bezeichnet wird. Ein OH^- ist dabei an Cu_B gebunden. Zur Stabilisierung wird ein Elektron und ein Proton vom proximalen Tyrosin (Y280) gezogen, was zur Bildung eines Tyrosinradikals führt.
- P_R -Intermediat: Ein weiteres Elektron reduziert das Tyrosinradikal zu O^- (P_R bzw. C_{3*} Zustand).
- F-Intermediat: Ein Proton wird aufgenommen und H_2O gebildet, welches an Cu_B gebunden bleibt (C_3 Zustand).
- O-Intermediat: Ein weiteres Proton und Elektron wird aufgenommen und der O-Zustand regeneriert [27].

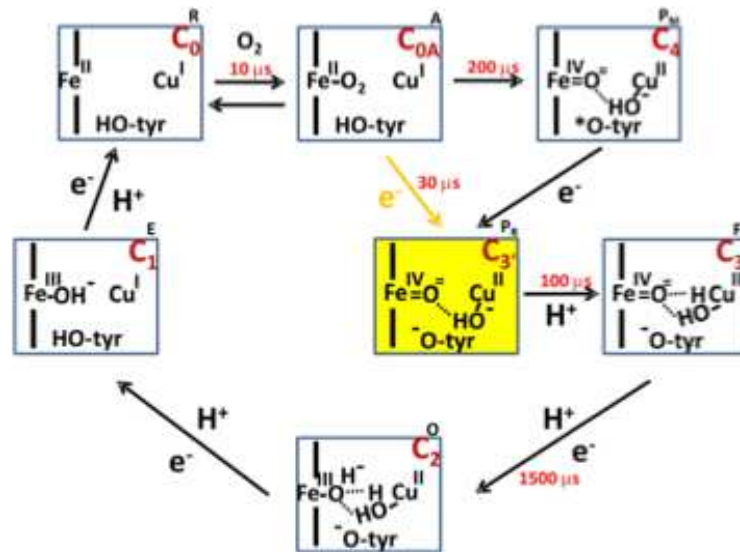


Abbildung 1.3: Katalytischer Zyklus von Cytochrom c Oxidase [27].

1.2.4. Die Cytochrom c Oxidase in der protein-tethered Bilayer Lipid Membrane

Membranproteine stellen für die Forschung eine große Herausforderung dar, da sie aufgrund ihrer Struktur mit sowohl lipophilen als auch hydrophoben Oberflächen schwer zu isolieren und funktional zu halten sind. Am besten eignen sich für diesen Zweck künstliche Membransysteme. Eines dieser Systeme ist die protein-tethered Bilayer Lipid Membrane (ptBLM)

Die ptBLM nutzt die auf einer Oberfläche immobilisierten Membranproteine als Anker für die dazwischen ausgebildete Lipidmembran. Das hat den Vorteil, dass sich zwischen Membran und Oberfläche ein kleiner Submembranraum befindet, der mit Pufferlösung gefüllt ist. Somit liegt das Protein selbst nicht auf einer Oberfläche auf, sondern ist wie in dessen natürlicher Umgebung von beiden Seiten von Wasser umgeben [28].

Für den Aufbau der ptBLM wird die Goldoberfläche des Siliziumkristalls mit DTNTA (Dithiobis-(nitroessigsäure-butylamidyl-propionat)) und DTP (3,3'-Dithiopropionat) funktionalisiert. DTNTA ist das Linkermolekül, welches nach Komplexierung mit Ni^{2+} -Ionen das Protein mittels des angehefteten His-Tags auf der Goldoberfläche

immobilisieren kann. DTP ist ein Spacermolekül und wird benötigt um die Packungsdichte der Proteine und Lipide zu kontrollieren. Ist die DTNTA-Konzentration zu groß, werden zu viele Proteine gebunden und die Konformationsänderungen der α -Helices und β -Sheets, welche während der Reaktion stattfinden, werden behindert. Ist die Konzentration zu klein, wird die Membran nur unzureichend oder nicht ausgebildet [29, 30].

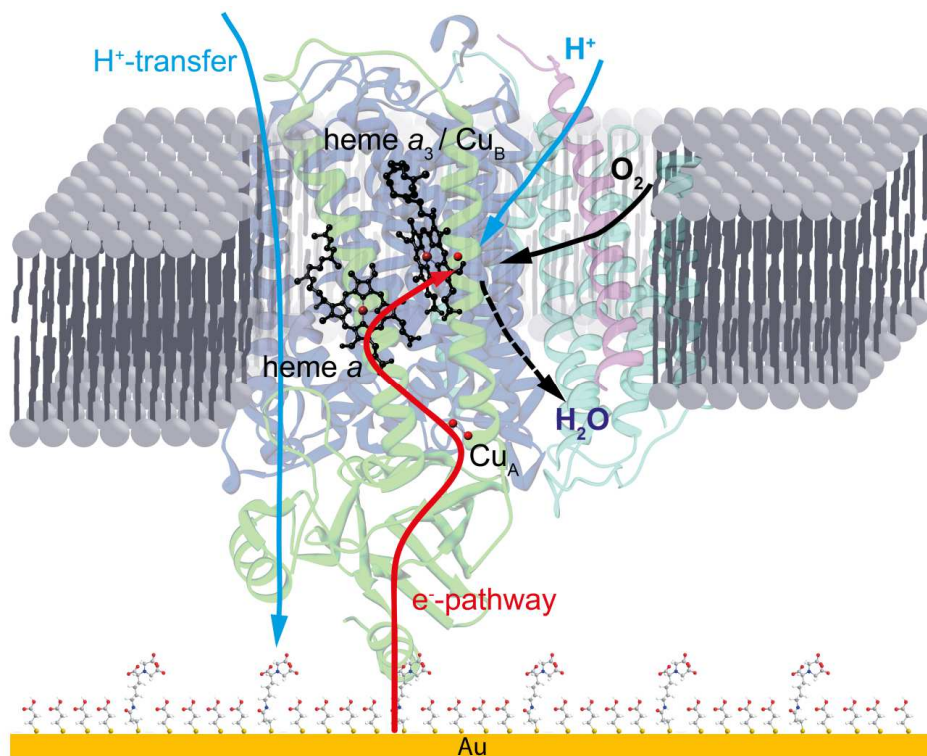


Abbildung 1.4: Die Cytochrom c Oxidase wird mittels His-Tag an einer Goldoberfläche immobilisiert und in eine künstliche Lipid-Membran aufgebaut. Elektronen werden von der Goldelektrode auf das Protein übertragen und reduzieren O₂ zu H₂O während Protonen über die Membran transferiert werden [31].

An das mit dem Ni-Ion komplexierte DTNTA wird das in Detergens solubisierte und mit His-Tag modifizierte Protein gebunden. Der His-Tag besteht aus 6 Histidinen. Danach wird in Detergens gelöstes 1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DiPhyPC) hinzugefügt. Schließlich wird das zum Lösen benutzte DDM

(Dodecylmaltosid) mittels in-situ Dialyse entfernt sodass sich zwischen den Proteinmolekülen eine Membran bildet [15, 29].

Somit erhält man einen Monolayer an Proteinen, welche alle gleich ausgerichtet und in eine künstliche Lipidmembran eingebettet sind. Das in dieser Arbeit benutzte Protein enthält den His-Tag an der Untereinheit II, sodass das Cu_A -Zentrum, so positioniert ist, dass es Elektronen über den DTNTA-Linker von der Au-Elektrode erhält. Somit ersetzt die Elektrode das Cytochrom c [32].

1.2.5. Vier-Elektronenübertragungsmodell

Zur Untersuchung des direkten Elektronentransfers in der ptBLM wurde das sequenzielle 4 Elektronentransfermodell entwickelt.

Das sequenzielle Modell [33] besagt, dass die Elektronen von der Elektrode an Cu_A übertragen und anschließend nur mehr zwischen den Zentren entsprechend $\text{Cu}_A \rightarrow \text{Häm } a \rightarrow \text{Häm } a_3 \rightarrow \text{Cu}_B$ ausgetauscht werden. Dieser Transfer wird in Abbildung 1.5 durch horizontale schwarze Pfeile dargestellt. Die Aufnahme eines weiteren Elektrons über Cu_A wird durch vertikale Pfeile dargestellt. Die zwei Redoxzustände der vier Zentren werden durch r (reduziert) und o (oxidiert) dargestellt. Bei jedem Elektronentransfer zwischen zwei Redoxzentren kann, abhängig vom Unterschied der pK-Werte, ein Proton aufgenommen oder abgegeben werden. Im Verlauf dieser Protonenaufnahme und -abgabe werden Protonen gepumpt.

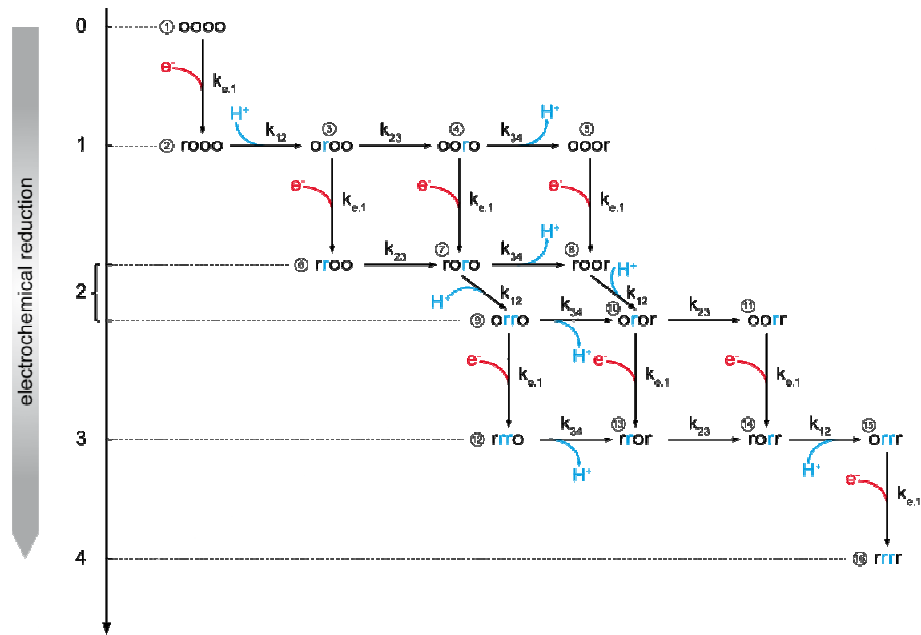


Abbildung 1.5: Kinetisches Schema des sequenziellen Modells unter anaeroben Bedingungen. Die Skala auf der y-Achse zeigt die aufgenommenen Elektronen. Dabei wird ein Elektron von Cu_A aufgenommen und an die weiteren Redoxzentren übertragen. Jedes Redoxzentrum kann in reduziertem (r), als auch in oxidiertem Zustand (o) vorhanden sein. Somit erhält man 16 Redoxzustände. Die roten Pfeile zeigen Elektronenaufnahme, die blauen Protonenaufnahme und -abgabe [31].

Für das Protein existieren 16 verschiedene Redoxzustände, welche als verschiedene Wahrscheinlichkeiten P behandelt werden. Die Veränderung der Wahrscheinlichkeiten mit der Zeit ist durch die Mastergleichung beschrieben.

$$\frac{d}{dt}P_j = \sum_{j \neq i} k_{ij}P_i - k_{ji}P_j \quad 1.2$$

Dabei sind k_{ij} und k_{ji} die Hin- und Rückreaktionskonstanten der Reaktion von Zustand i zu Zustand j . Die Gleichgewichtskonstante ist definiert durch $K = \frac{k_{ij}}{k_{ji}}$. Die Summe aller Redoxzustände ist dabei immer = 1.

$$\sum_{i=1}^{16} P_i = 1 \quad 1.3$$

Ist die Reaktionsrate der Vorwärtsreaktion bekannt, kann man den Elektronenfluss J_{lm} zwischen den Zentren l und m berechnen.

$$J_{lm} = \Gamma A \left(k_{lm} P_i - k_{ml} e^{\frac{nF(E_l^0 - E_m^0)}{RT}} \frac{(1 + 10^{pK_l^r - pH})}{(1 + 10^{pK_l^o - pH})} \frac{(1 + 10^{pK_m^o - pH})}{(1 + 10^{pK_m^r - pH})} P_j \right) \quad 1.4$$

Jedoch ist diese Formel nur bei Reaktionen zweiter Ordnung anwendbar. Bei Cu_A ist die Elektronentransferrate entsprechend der Butler-Volmer-Gleichung auch von dem angelegten Potentialen abhängig. Somit lässt sich der Strom i^e beim Elektronentransfer zu Cu_A berechnen. Dabei ist k_e die elektrochemische Geschwindigkeitskonstante, Γ die Oberflächenkonzentration und A die Elektrodenfläche [31].

$$i^e = -FAk_e\Gamma \sum_{i \neq j} \left(P_i e^{\frac{F\alpha(E_1^0 - E)}{RT}} \left(\frac{1 + 10^{pK_1^r - pH}}{1 + 10^{pK_1^o - pH}} \right)^\alpha - P_j e^{\frac{-F(1-\alpha)(E_1^0 - E)}{RT}} \left(\frac{1 + 10^{pK_1^r - pH}}{1 + 10^{pK_1^o - pH}} \right)^{-(1-\alpha)} \right) \quad 1.5$$

1.2.6. Bisherige spektroskopische Untersuchungen an Cytochrom c Oxidase

Zum Verständnis der Funktionsweise der CcO wurden verschiedenste Methoden wie Röntgenstrukturanalyse [9, 20], genetische Manipulationen [6], elektrochemische und elektrometrische, sowie die verschiedensten spektroskopischen Techniken, wie UV- oder Raman- und Infrarotspektroskopie [34, 35] eingesetzt.

Röntgenstrukturanalysen zeigten Unterschiede der Konformation zwischen dem reduzierten und oxidierten Enzym. Dieser Unterschied besteht in der Verschiebung von Häm a_3 , der Bewegung von Aminosäureresten von Helix VIII und dem Entstehen eines Wassermoleküls im BNC. Jedoch zeigen diese Analysen nur Momentaufnahmen des Enzymkomplexes. Zur genauen Untersuchung ist es

notwendig das Protein während der Reaktion zu beobachten. Dies ist mittels Röntgenstrukturanalyse bisher nicht möglich [20].

Gorbikova et al. nutzte die elektrochemische Titration der CcO aus *Paracoccus denitrificans* in Gegenwart von Mediatoren, um Veränderungen der IR-Banden während der Redoxvorgänge zu beobachten. Mit Hilfe von simultan durchgeführter UV/VIS Spektroskopie war es möglich den IR-Banden verschiedene Redoxzustände der Zentren zuzuordnen [35]. In einer zeitaufgelösten FTIR Studie wurde dagegen das Enzym mittels CO reduziert und in Gegenwart von Sauerstoff reoxidiert nachdem mittels Photodissoziation das CO abgespalten worden war. Dabei zeitaufgelöste FTIR Spektren aufgenommen. Die Messungen ergaben, dass die Reoxidation im Sekundenbereich abläuft [34].

Die bisherigen Untersuchungen mittels Infrarotspektroskopie wurden meist in Gegenwart von Mediatoren durchgeführt. Das kann dazu führen, dass es zu einer von einander unabhängigen Reduktion der einzelnen Redoxzentren kommt. Des Weiteren ist diese Reaktion diffusionsabhängig und somit nicht unmittelbar steuerbar.

Deshalb wurde für diese Arbeit das Enzym in eine ptBLM eingebettet. Durch die einheitliche Orientierung wird der direkte Elektronentransfer von der Metallelektrode in das Cu_A des Enzyms ermöglicht. Somit ist die Reduktion des Proteins unmittelbar steuerbar. Durch diese experimentelle Anordnung ist es möglich, die Konformationsänderungen während der katalytischen Reaktion mittels zeitaufgelöster IR-Spektroskopie zu beobachten und dadurch Rückschlüsse auf die Reaktionskinetik zu ziehen.

1.3. Infrarotspektroskopie

Die Infrarotspektroskopie hat sich als modernes, schnelles und einfaches Verfahren zur qualitativen und quantitativen Analyse von Substanzen etabliert. Dabei wurde es vor allem für die Analyse kleiner Moleküle eingesetzt. Die ATR-Technik ermöglichte es weiter, Proben ohne Vorbehandlung zu analysieren. Mittlerweile wird die IR-Spektroskopie auch zur Analyse von Makromolekülen wie Proteinen genutzt

1.3.1. Molekülschwingungen

Infrarote Strahlung ist elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von 800 nm bis 1 mm. Dieser wird nochmals in nahes Infrarot (0.8-2.8 μm), mittleres Infrarot (2.5-25 μm) und fernes Infrarot (25-1000 μm) unterteilt. Für die Infrarotspektroskopie ist vor allem der mittlere IR-Bereich bedeutend, da in diesem Bereich die Moleküle zur Schwingung und Rotation angeregt werden können. In der Infrarotspektroskopie wird anstatt der Wellenlänge λ [μm] vorwiegend die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] benutzt.

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} \quad 1.6$$

Der Wellenzahlbereich von mittlerem Infrarot liegt von 4000 – 400 cm^{-1} .

Infrarotspektroskopie ist die Messung von Rotations- und Vibrationsübergängen, vorwiegend vom Grundzustand in den ersten angeregten Zustand oder umgekehrt. Interagiert ein Molekül mit Strahlung, wird ein Photon absorbiert welches genau die Energie besitzt, die es von vom Grundzustand in den angeregten Zustand versetzt. Voraussetzung für die Absorption von IR-Strahlung ist das Vorhandensein eines sich ändernden Dipolmoments im Molekül während der Schwingung. Je ausgeprägter die Dipolmomentänderung, desto intensiver ist die Bande. Das heißt, dass Moleküle, welche aus gleichen Atomen bestehen (z.B.: O_2 , N_2 ,...) IR-Strahlung nicht absorbieren können. Andere Moleküle wie HCl, H_2O oder CO_2 besitzen sowohl IR-

aktive (Änderung des Dipolmoments) als auch IR-inaktive Schwingungen (keine Änderung des Dipolmoments).

Zum besseren Verständnis wird ein zweiatomiges Molekül mit den Massen m_1 und m_2 angenommen, welches durch eine Feder mit der Länge r verbunden ist. Wenn die beiden Atome auseinander bewegt werden (Δr) kommt es zu einer Dehnung der Feder. Die dabei entstehende rücktreibende Kraft F ist entsprechend dem Hooke'schen Gesetz direkt proportional zu der Auslenkung. Dabei ist K die Federkonstante.

$$F = -K \cdot \Delta r \quad 1.7$$

Der harmonische Oszillator ist ein Modell für die Energieübergänge der Schwingungszustände.

Als Vereinfachung für die Berechnung wird meist die reduzierte Masse μ verwendet:

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad 1.8$$

Für die Berechnung der Frequenz einer Schwingung wird die Formel 1.9 genutzt.

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}} \quad 1.9$$

Das Potential eines harmonischen Oszillators wird durch eine quadratische Funktion beschrieben

$$V_{(x)} = \frac{1}{2} k x^2 \quad 1.10$$

Entsprechend steigt die Energie im Potentialtopf bei stärkerer Dehnung der Bindung gegen unendlich an. Bei einer chemischen Bindung ist dies nicht der Fall. Hier

kommt es bei zu starker Streckung kommt es zum Bindungsbruch und bei zu starker Annäherung stoßen sich die Atome ab. Dadurch ist die Schwingung nicht mehr harmonisch. Zur Beschreibung wird das Morse-Potential genutzt.

$$v_0 = \frac{a}{2\pi} \sqrt{\frac{2D_e}{m}} \quad 1.11$$

Dabei ist D_e die Dissoziationsenergie und a eine Konstante. Dieses Modell wird als anharmonischer Oszillator bezeichnet.

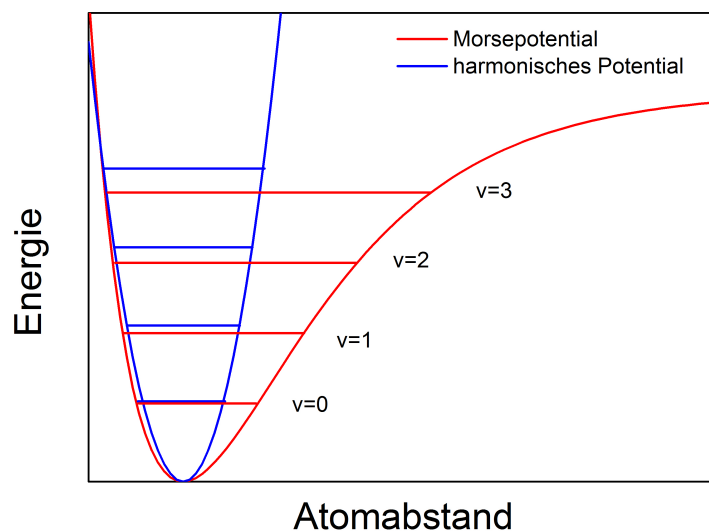


Abbildung 1.6: Energieniveaus von harmonischen und anharmonischen Oszillator. Die einzelnen Energiestufen sind beim harmonischen Oszillator im gleichen Abstand, beim anharmonischen Oszillator wird der Abstand bei höheren Energiestufen geringer.

Die Anregung vom Grundzustand in den ersten angeregten Zustand nennt man Grundschiwingung. IR-Strahlung kann nur absorbiert werden wenn die Strahlung dieselbe Frequenz wie die Grundschiwingung hat. Neben dieser gibt es Obertöne, welche durch die Anregung vom Grundzustand in den 2. oder höheren angeregten Zustand gebildet werden. Dabei ist die Frequenz ein Vielfaches der Grundschiwingung.

Es gibt 2 verschiedene Vibrationszustände, Valenz- und Deformationsschwingungen. Beide können sowohl symmetrisch als auch asymmetrisch sein. Da es bei symmetrischen Schwingungen seltener zu einer Veränderung des Dipolmoments kommt, gibt es davon weniger IR-aktive Vibrationen. Des Weiteren sind sie auch generell schwächer [36].

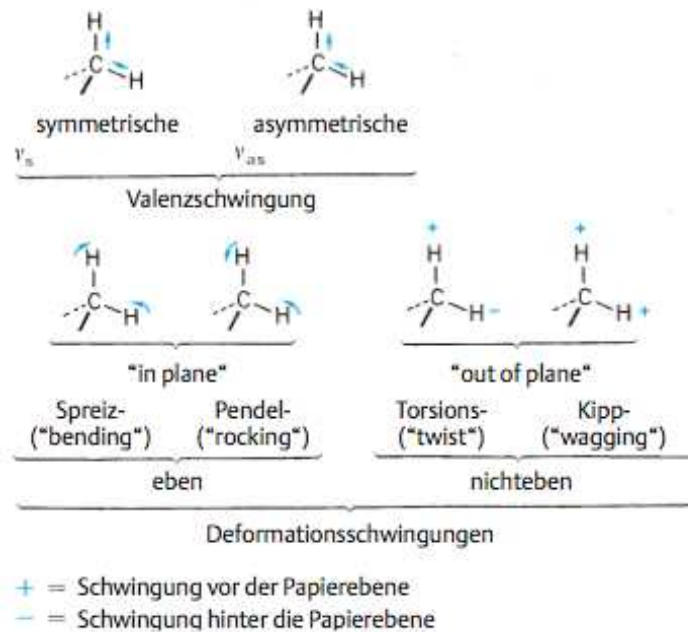


Abbildung 1.7: Valenz- und Deformationsschwingung am Beispiel der Methylen-Schwingungen [37].

1.3.2. Infrarotspektroskopie an Proteinen

In der Infrarotspektroskopie absorbieren funktionelle Gruppen bei verschiedenen Wellenzahlen. Diese Absorption zeigt sich als Bande im Spektrum. Das macht die Identifikation von kleinen Molekülen schnell und einfach. Im IR-Spektrum von Proteinen ist die Information von allen IR-aktiven Bindungen vorhanden. Aufgrund der Größe und der inner- und intermolekularen Wechselwirkungen ist die Identifikation einzelner Banden erheblich schwerer, da viele dieser Banden überlappen. Bei den intermolekularen Wechselwirkungen spielen vor allem die Wasserstoffbrücken eine entscheidende Rolle zur Stabilisierung von α -Helices und β -Sheets.

Unterschiedliche Schwingungen des Protein-Rückgrats verursachen verschiedene Absorptionsbanden im IR-Spektrum. Diese charakteristischen Banden werden als Amid-Banden bezeichnet, die sich jeweils aus mehreren Schwingungen zusammensetzen. Insgesamt gibt es 9 Amidbanden. Für die Proteinuntersuchung sind vor allem die Banden Amid I, II und III geeignet, wobei für die Untersuchung von Konformationsänderungen vorwiegend die Amid I Bande ($1700-1600\text{ cm}^{-1}$) benutzt wird.

Tabelle 1: Amidbanden und deren Zusammensetzung [36]

Amid Bande	Wellenzahl	Zuordnung
A	3300	N-H Streckschwingung
B	3110	N-H Streckschwingung
I	1653	80% C=O Streckschwingung 10% C-N Streckschwingung 10% N-H Biegeschwingung
II	1567	60% N-H Biege, 40% C-N Streck
III	1299	30% C-N Streck-, 30% N-H Biege-, 10% C=O Streck-, 10% O=C-N Biege-, 20% andere Schwingungen
IV	627	40% O=C-N Biegeschwingung; 60% andere Schwingungen
V	725	N-H Biegeschwingung
VI	600	C=O Biegeschwingung
VII	200	C-N Torsion

Die einzelnen Banden sind aus den Absorptionen der verschiedenen Sekundärstrukturen zusammengesetzt. Somit hat die Zusammensetzung der Sekundärstruktur eines Proteins Einfluss auf die Lage und Form der Banden [38].

Tabelle 2: Sekundärstrukturen in den Amidbanden [36]

Sekundärstruktur	Amid I Bande	Amid II Bande	Amid III Bande
α-Helix	1648-1655	1545-1550	1260-1290
Random	1656-1660	1520	-
β-Faltblatt	1630-1636	1520-1530	1235
β-Turn	1660-1671	-	-

Die Untersuchung von Proteinen erfolgt in den meisten Fällen in wässriger Umgebung (Puffer), da sie unter wasserfreien Bedingungen nicht funktionell sind und denaturieren. Wasser ist ein starker Absorber von IR-Strahlung und muss somit bei den Spektren die O-H Biegeschwingung des Wassers bei 1645 cm^{-1} abgezogen werden, da diese Bande im Bereich der Amid I Bande liegt. Als Alternative für H_2O wird in manchen Fällen D_2O als Lösungsmittel benutzt. Dadurch wird die Lösungsmittelbande nach 1215 cm^{-1} (D-O-D Biegeschwingung) verschoben. Ein Nachteil dieser Methode ist die Verschiebung der Amid-Banden [36]. Außerdem kommt es aufgrund des H/D-Austausches und der stärkeren D-Brücken zu einer verringerten Flexibilität des Proteins [39].

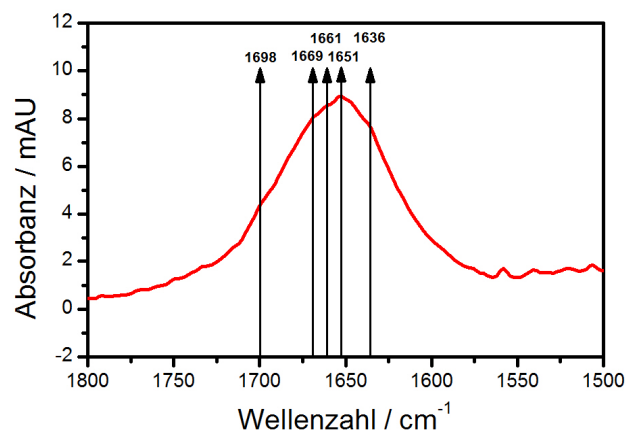


Abbildung 1.8: Die Amid I Bande im unmodulierten Spektrum von Cytochrom c Oxidase wird durch eine große Wasserbande bei 1645 cm^{-1} (H-O-H – Biegeschwingungen) dominiert. Dabei werden die einzelnen Komponenten des Proteins überdeckt.

Abbildung 1.8 zeigt eine Amid I Bande. Man kann mehrere kleine Schultern (Pfeile) der Bande erkennen, jedoch ist die Auswertung aufgrund des Vorhandenseins von Wasser und der starken Überlappung der kleineren Banden nicht möglich. Um genauere Informationen über die Zusammensetzung der Amid I Bande zu erhalten, ist es notwendig diese aufzutrennen. Hierfür gibt es verschiedene Möglichkeiten, wobei die beste Methode das Anpassen von Banden (i.e. curve fit) ist. Dabei werden mehrere kleinere Banden in die gemessene Bande angepasst und deren Parameter (Position, Intensität, Fläche, Halbwertsbreite) solange über einen Computeralgorithmus angepasst, bis diese möglichst gut die umhüllende Bande darstellen. Dabei wird meist der „least-squares minimization“-Algorithmus genutzt. Als Bandenformen werden Gauß-, Lorentz- oder Voigtkurven (eine

Zusammensetzung von Gauß- und Lorentzkurve) genutzt. Eine oft verwendete Form für IR-Banden ist die Lorentzkurve. Diese zeichnet sich vor allem durch ihre langen Ausläufer aus (Abbildung 1.9) [36, 38, 40]. In dieser Arbeit wurden Daten aus der PSD-Analyse genutzt um die einzelnen Banden zu isolieren und so Wasser aus dem Spektrum abziehen (siehe Kapitel 3.2.3).

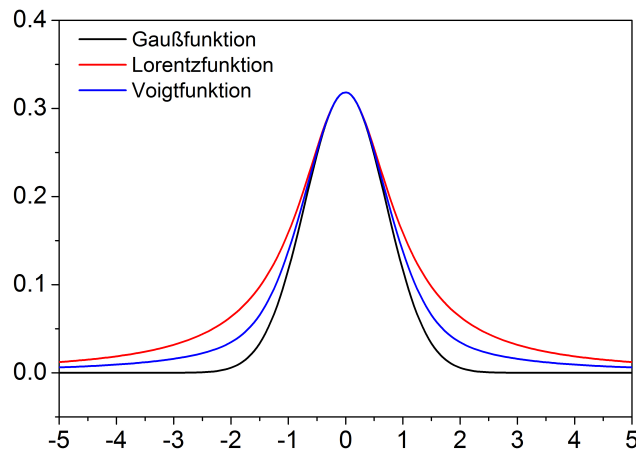


Abbildung 1.9: Vergleich der Form von Gauß-, Lorentz und Voigtfunktion.

1.3.3. FTIR-Spektroskopie

Es gibt zwei unterschiedliche Arten von Infrarotspektrometern. Die ersten Geräte waren dispersive Geräte, später wurde das Fourier-Transform-IR-Spektrometer (FT-IR-Spektrometer) entwickelt. Bei ersterem wird der Strahl von der Strahlenquelle durch einen Strahlenteiler aufgetrennt wobei einer der Strahlen durch die Probenkammer geht, wo eine Absorption von einzelnen Wellenzahlen durch die Probe erfolgt und der andere durch ein Referenzmedium geführt wird. Nach der Probenkammer werden die Strahlen wieder vereint (Nullabgleich) und auf ein Gitter oder Prisma gelenkt. Dort kommt es zur Aufspaltung des Strahls in verschiedene Wellenlängen. Die einzelnen Wellenlängen werden vom Detektor registriert und in elektrische Signale umgewandelt.

Die Fourier-Transform-IR-Spektrometer (FTIR-Spektrometer) basieren auf einem Michelson Interferometer. Der Lichtstrahl wird von der Quelle auf einen halbdurchlässigen Spiegel geleitet. Ein Strahl mit halber Intensität geht zu einem

stationären Spiegel und wird reflektiert. Der andere Strahl wird auf einen beweglichen Spiegel gelenkt, der sich mit konstanter Geschwindigkeit vor und zurückbewegt. Durch die Bewegung wird der Weg, den der Strahl zurücklegen muss verlängert bzw. verkürzt. Die beiden reflektierten Strahlen treffen beim halbdurchlässigen Spiegel aufeinander und es kommt zur Interferenz. Diese kann, abhängig von der Spiegelposition sowohl konstruktiv, als auch destruktiv sein. Der Strahl wird weiter auf die Probe gelenkt und anschließend von einem Detektor analysiert. Um die exakte Spiegelposition zu bestimmen zu können, durchwandert ein Laser mit exakt bekannter Wellenlänge ebenfalls den Strahlengang.

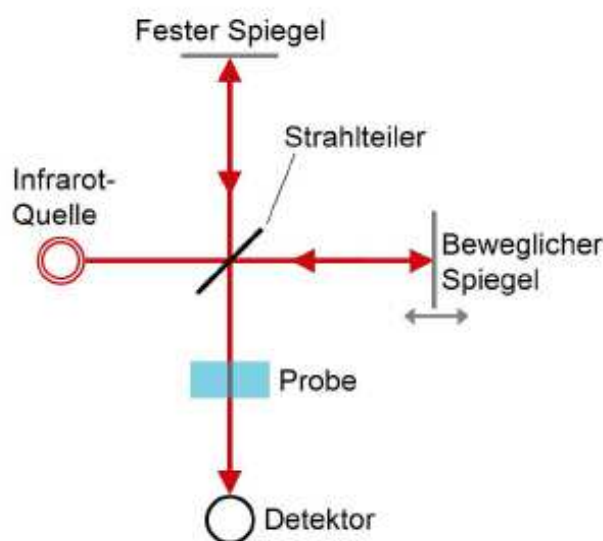


Abbildung 1.10: Schematischer Aufbau eines Fourier-Transform Infrarotspektrometers. Der IR-Strahl wird von einem halbdurchlässigen Spiegel (Strahlteiler) zu einem festen und einem beweglichen Spiegel geleitet. Nach der Reflexion treffen sie am Strahlteiler aufeinander und es kommt zur konstruktiven oder destruktiven Interferenz. Der Strahl wird durch die Probe geleitet und das Interferogramm vom Detektor aufgezeichnet [16].

Im Gegensatz zum dispersiven Spektrometer erhält man beim FT-IR ein Interferogramm (Intensität in Abhängigkeit von der Spiegelposition). Dabei ist die Intensität maximal, wenn statischer und mobiler Spiegel vom halbdurchlässigen Spiegel exakt gleich weit entfernt sind. Bei diesem sogenannten „centerburst“ interferieren alle Wellenlängen konstruktiv. Das Interferogramm wird mittels Fourier-Transformation in ein IR-Spektrum (Intensität in Abhängigkeit von Wellenzahl) umgewandelt. Die Vorteile dieser Methode sind die Schnelligkeit und das bessere Signal zu Rausch Verhältnis [37].

Als IR-Quelle wird in den meisten Fällen ein Globar für den mittleren IR-Bereich genutzt. Daneben werden noch Hochdruck Quecksilberlampen für den fernen IR-Bereich und Tantal-Halogenlampen für den nahen IR-Bereich genutzt. Die meistens eingesetzten Detektoren sind Deuterium-Triglycin Sulfat (DTGS) oder Quecksilber Cadmium Tellurit (MCT) wobei letztere mit flüssigen Stickstoff gekühlt werden müssen [36].

1.3.4. ATR-FTIR-Spektroskopie

Die Standardmethode in der IR-Spektroskopie ist die Transmission. Dabei wird die Probe in eine Zelle aus IR-durchlässigem Material (NaCl, KBr, CaF₂,...) gegeben und durchstrahlt. Der Vorteil ist, dass die Messungen schnell und leicht durchzuführen sind.

Eine weitere Probentechnik ist die ATR-Spektroskopie (Attenuated Total Reflectance Spectroscopy = Abgeschwächte Totalreflexionsspektroskopie). Trifft ein Lichtstrahl, welcher sich in einem Medium mit höherem Brechungsindex (n_1) bewegt, auf ein Medium mit geringerem Brechungsindex (n_2), kommt es abhängig vom Einfallswinkel zu zwei Phänomenen. Ist der Einfallswinkel kleiner als der kritische Winkel (θ), wird das Licht im dünnerem Medium vom Einfallslot weg gebrochen. Wenn der Einfallswinkel größer als der kritische Winkel ist kommt es an der Grenzfläche zur Totalreflexion. Der kritische Winkel ist definiert als:

$$\sin(\theta) = \frac{n_1}{n_2} \quad 1.12$$

Diese Totalreflexion wird bei der ATR-Spektroskopie genutzt. Dabei wird ein Kristall aus einem Material mit sehr hohem Brechungsindex als internal reflection element (IRE) eingesetzt. Der IR-Strahl wird in den Kristall geleitet und reflektiert an der Grenzschicht zur Probe. Goos und Hänchen [41, 42] zeigten, dass es zu einer Versetzung der Reflexion kommt. Anfangs wurde davon ausgegangen, dass der Strahl in die Probe eindringt und es in der Probe zur Reflexion kommt. Heute weiß man, dass im dichteren Medium eine stehende Welle, welche normal zur

Reflexionsebene steht, und ein evaneszentes Feld im dünneren Medium gebildet werden. Das evaneszente Feld dringt in die Probe ein, wobei die Intensität exponentiell zur Entfernung von der Reflexionsebene abnimmt. Es kommt zu einer Absorption von Energie durch die Probe und somit zu einer Abschwächung des Strahls [43].

Die Eindringtiefe der evaneszenten Welle entspricht in etwa der vierfachen Wellenlänge. Diese ist abhängig von Wellenlänge, Einfallswinkel und Brechungsindex der beiden Medien (n_1, n_2) [44].

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2(\theta) - n_2^2}} \quad 1.13$$

Die Anforderungen an das interne Reflexionselement sind sehr hoch und abhängig von der Probe. Da IRE aus verschiedenen Materialien selbst Strahlung bei unterschiedlichen Wellenzahlen absorbieren, sollten sie so gewählt werden, dass sie nicht im Absorptionsbereich der Probe liegen. Das IRE soll chemisch inert und nicht löslich sein. Als ATR-Kristalle bieten sich verschiedene Materialien an. Diese sind eher hart und haben einen sehr hohen Brechungsindex. Dazu gehören Diamant, Zinkselenid (ZnSe), Germanium (Ge) und Thallium-Iodid (KRS-5). Die einfachste IRE-Form ist das Prisma. Daneben werden Dove-Prismen, halbkugelförmige oder halbzylinderförmige Elemente verwendet [44].

Tabelle 3: Brechungsindex, kritischer Winkel und genutzte Wellenlänge von Materialien von ATR-Kristallen

	Wellenlänge(μm)	Brechungsindex (Durchschnitt)	Kritischer Winkel (Θ_{cr})
Si [44]	1.1-6	3.5	15.6°
Ge [44]	2-12	4	14.5°
Al ₂ O ₃ [44]	0.22-4.5	1.7	34.5°
Quarz [44]	0.3-2.3	1.43	44.5°
ZnSe [36]	0.5-20	2.4	-
KRS-5 [36]	0.6-40	2.4	-
Diamant [45]	0.4-100	2.4	-

1.3.5. Zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie

Zeitaufgelöste Fourier Transform Infrarotspektroskopie (tr-FT-IR-Spektroskopie) ist eine Technik zur Untersuchung von dynamischen Systemen. Es gibt zwei verschiedene Techniken.

Rapid Scan

Die Rapid-Scan Technik ist die einfachste angewandte Methode für zeitaufgelöste Messungen. Der bewegliche Spiegel des Interferometers wird, wie bei normalen Messungen mit konstanter Geschwindigkeit bewegt. Während eines Scans werden die Datenpunkte für ein Interferogramm gemessen. Somit wird ein Interferogramm (i.e. Spektrum) nach dem anderen gemessen. Die Zeitauflösung ist dabei von der Spiegelgeschwindigkeit abhängig. Dadurch besteht eine Einschränkung bei schnellen Systemen [45, 46].

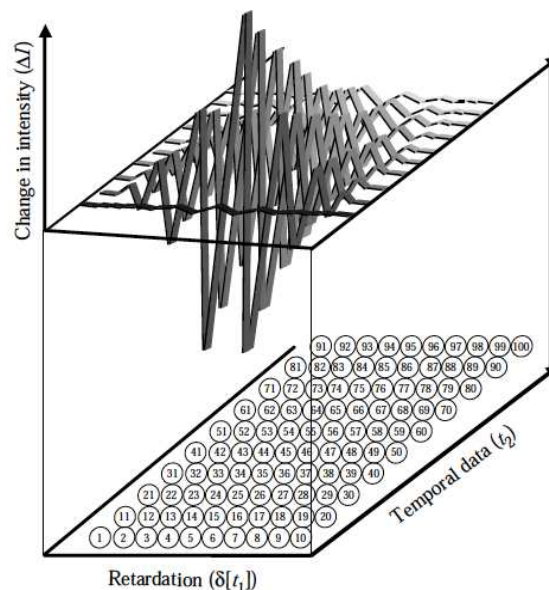


Abbildung 1.11: Schematischer Ablauf einer Rapid-Scan Messung. Dabei geben die Nummern in den Kreisen die Reihenfolge der Messung der Datenpunkte an. Die Datenaufnahme der Interferogramme erfolgt der Reihe nach, Interferogramm für Interferogramm [45].

Step Scan

Die zweite Methode ist die Step-Scan Technik. Voraussetzung dafür ist ein reversibles System und ein Trigger, der das Experiment bzw. die Messung startet und miteinander synchronisiert. Im Gegensatz zu einer normalen Probenmessung, bei der das gesamte Interferogramm eines Spektrums auf einmal aufgenommen wird, erfolgt die Datenerfassung nach einem anderen Prinzip. Der bewegliche Spiegel des Interferometers wird auf bestimmte diskrete Positionen bewegt (i.e. Retardierung) und nach kurzer Wartezeit (für das Abbremsen und die Stabilisierung des Spiegels) wird die zeitaufgelöste Messung des Datenpunkts begonnen. Nach der Messung wird der Spiegel zur nächsten Position bewegt. Diese Interferogrammpunkte können zur Verringerung des SNR mehrmals abgefahren werden. Da jetzt nicht mehr ein gesamtes Interferogramm, sondern nur einzelne Interferogrammpunkte gemessen werden, müssen diese vom Computer nach der Messung zu einem Interferogramm zusammengefasst werden.

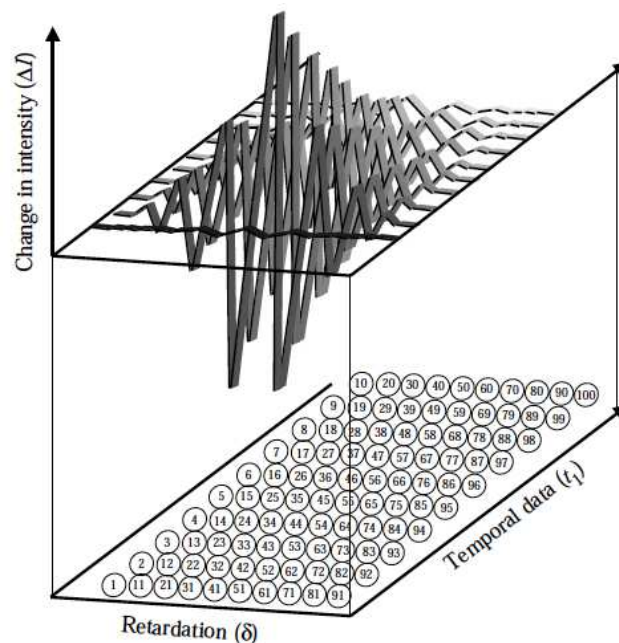


Abbildung 1.12: Schematischer Ablauf einer Step-Scan Messung. Die Nummern in den Kreisen geben die Reihenfolge der gemessenen Datenpunkte an. Die Aufnahme der Datenpunkte erfolgt mit gleicher Retardierung über die Zeitachse des Experiments [45].

Da der bewegliche Spiegel während der Messung steht, ist die Zeitauflösung nicht mehr von der Spiegelgeschwindigkeit abhängig. Somit ist die Technik besonders gut für sehr schnelle Systeme geeignet. Das Limit liegt bei 1ns [45].

1.3.6. Oberflächenverstärkte Infrarot-Absorbanz-Spektroskopie (SEIRAS)

Das Arbeiten mit Monolayern hat den großen Nachteil, dass deren Absorbanz dieser relativ gering ist. Des Weiteren ist das Signal zu Rausch-Verhältnis meist gering und erschwert die Auswertung oder führt zu keiner Identifikation des Signals.

Zur Erhöhung der Sensitivität bei sehr dünnen Filmen wurde die Oberflächenverstärkte Infrarotspektroskopie (SEIRAS = Surface-Enhanced Infrared Absorbance Spectroscopy) entwickelt.

Anfang der 1980er Jahre wurde von Hartstein eine wesentliche Verbesserung der Signal-Intensität und des Signal zu Rausch-Verhältnisses beobachtet, indem man eine sehr dünne aber raue Metalloberfläche nutzte um sehr dünne Proben mittels Infrarotspektroskopie zu untersuchen [47].

Im Experiment von Hartstein wurde ein nur wenige Nanometer dicker Goldfilm auf einen ATR-Kristall aufgedampft, wodurch sich das Signal um das bis zu 10^4 -fache erhöht. Der Mechanismus der Signalverstärkung beruht auf der Verstärkung des elektromagnetischen Feldes. Durch Bestrahlung des dünnen Films, welcher aus kleinen Metallinseln (kleiner als die eingestrahlte Wellenlänge) besteht, kommt es zur Anregung lokaler Plasmonen und Ausbildung eines elektromagnetischen Feldes, welches stärker ist als das des einfallenden Strahles. Das Feld interagiert mit der auf der Metalloberfläche aufgetragenen Probe und verstärkt somit dessen Signal [48]. Aufgrund der Metallschicht auf dem Kristall ist keine Messung bei s-polarisierter Strahlung möglich und es werden nur Dipolveränderungen entlang der z-Achse verstärkt.

Die Untersuchung der Cytochrom c Oxidase benötigt aufgrund der elektrochemischen Anregung eine leitende Oberfläche. Die Rauigkeit der zur Oberflächenverstärkung aufgetragenen Nanopartikel sollte nicht zu hoch sein, damit sich trotz der Unebenheiten eine Membran bilden kann. Bei herkömmlichen Strukturen zur Oberflächenverstärkung wäre das nicht gewährleistet. Die von Nowak et al. [49] entwickelte Two-Layer-Gold-Surface (TLGS) behebt dieses Problem. Die 30nm dicke Goldschicht sorgt für eine ausreichende Leitfähigkeit und die

Nanopartikel sorgen weiters für eine Verstärkung des Signals. So konnte das Signal gegenüber einer ebenen Goldschicht um das 6-fache verbessert werden.

1.3.7. Modulierte Anregung

Es gibt verschiedene Möglichkeiten das Signal zu Rausch Verhältnis zu verbessern. Zum einen kann man die Anzahl der Scans erhöhen. Das SNR verändert sich jedoch mit der Quadratwurzel der Scanzahl. Bei einer Vervielfachung der Scanzahl (bzw. Messzeit) kommt es zu einer Verbesserung um das Doppelte. Eine weitere Möglichkeit ist die modulierte Anregung (Modulatedexcitation (ME)). Hier können verschiedene Methoden angewandt werden um ein reversibles System periodisch anzuregen. Zu den Methoden gehören Temperatur, Druck, elektrische Potentiale oder auch UV-Licht.

Wird ein System durch ME angeregt, so reagiert es periodisch auf die Anregungsfrequenz. Die Anregung führt zu einer periodischen Veränderung der Konzentration der angeregten Spezies $c_i(t)$ und somit zu einer zeitlichen Veränderung der Absorbanz.

$$A(\tilde{\nu}, t) = \sum_i A_i(\nu, t) = \sum_i \varepsilon(\tilde{\nu}, t) \cdot c_i(t) \cdot d(t) = -\log \frac{I_S(\tilde{\nu}, t)}{I_R(\tilde{\nu}, t)} \quad 1.14$$

$I_S(\nu, t)$ und $I_R(\nu, t)$ sind die Intensitäten der Einzelkanalspektren von Probe (S) und Referenz (R).

Nach einer Einschwingungsphase verändert sich das Signal periodisch um einen Mittelwert. Da das angeregte System etwas zeitversetzt zu der Anregung reagiert kommt es zu einer Phasendifferenz $\varphi_{i,k}$ (Phase-Lag). Während dieser Anregungen kommt es zur Aufnahme zeitaufgelöster Spektren [50].

Mithilfe phasensensitiver Detektion (PSD) können die einzelnen modulierten Absorbanzen der Anregungsfrequenz (ω) und dessen Vielfachen zugeordnet werden und die Amplituden und Phaselags der erhaltenen Daten zu evaluieren [51].

1.3.8. Phasensensitive Detektion

Phasensensitive Detektion (PSD) wird neben der Verbesserung des Signal zu Rausch Verhältnisses auch genutzt um einzelne Banden zu Identifizieren.

Wird ein System periodisch angeregt, kommt es zu einer Reaktion des Systems. Diese kann in zwei Anteile zerlegt werden. Zum einen in Anteile, die nicht auf die periodisch modulierte Anregung reagieren (DC-Anteil) und Anteile die mit der Anregungsfrequenz mitschwingen (AC-Anteil). Störende Signale, wie das unmodulierte Hintergrundrauschen bilden den DC-Anteil und sollen von der modulierten Systemantwort (AC-Anteil) getrennt werden. Phasensensitive Detektion ist in der Lage, diese Anteile voneinander zu trennen und so das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern [50].

Des Weiteren kann man mittels PSD stark überlappende Banden auftrennen. Voraussetzung dafür ist, dass die Banden einen unterschiedlichen Phase-Lag haben. Das heißt, sie müssen mit einer unterschiedlichen Rate auf die Modulation reagieren.

Grundlagen der PSD

Bei einer modulierten Anregung kann die Absorbanz als Fourier-Folge dargestellt werden.

$$A(\tilde{\nu}, t) = \sum_{i=1}^N A_{i,0}(\tilde{\nu}) + \sum_{i=1}^N \sum_{k=1}^{\infty} A_{i,k}(\tilde{\nu}) \sin(k\omega t + \varphi_{i,k}) \quad 1.15$$

Der erste Teil stellt die Gesamtabsoorbanz des nichtmodulierten Systems dar (DC-Teil) und der zweite Teil die Absorbanz des modulierten Systems. Dabei ist $k=1$ die Grundschiwingung bzw. $k>1$ dessen Obertöne.

Um den Phaselag und die Amplitude bestimmen zu können wird die Fourierserie mit der Funktion $\sin(k\omega t + \phi_k^{PSD})$ multipliziert und über die Periode $T = 2\pi/\omega$ integriert.

Dadurch wird der Phasenwinkel ϕ_k^{PSD} eingeführt. Das phasenaufgelöste Absorbanzspektrum wird berechnet durch:

$$A_k(\tilde{\nu}, \phi_k^{PSD}) = \sum_{i=1}^N A_{i,k}(\tilde{\nu}, \phi_k^{PSD}) = \frac{2}{T} \cdot \int_0^T A(\tilde{\nu}, t) \sin(k\omega t + \phi_k^{PSD}) dt \quad 1.16$$

Durch Umformung erhält man:

$$A_k(\tilde{\nu}, \phi_k^{PSD}) = \sum_{i=1}^N A_{i,k}(\tilde{\nu}) \cos(\phi_{i,k} - \phi_k^{PSD}) \quad 1.17$$

Die Auftrennung einer Bande in dessen Komponenten erfolgt nach einem einfachen Prinzip. Angenommen eine Bande besteht aus zwei Komponenten A und B mit unterschiedliche Phaselags α und β . Komponente A zeigt in dem phasenaufgelösten Spektrum $\phi_k^{PSD} = \alpha$ die maximale Absorbanz. Aufgrund der Eigenschaften der Cosinusfunktion (Gleichung 1.17) besitzt Komponente A im phasenaufgelösten Spektrum $\phi_k^{PSD} = \alpha \pm 90^\circ$ keine Absorbanz. Folglich stammt die gesamte Absorbanz in dem phasenaufgelösten Spektrum von Komponente B. Auf diese Weise können von jeder Bande die Bandenposition und die Halbwertsbreite bestimmt werden [50, 51].

1.4. Cyclovoltammetrie

Die Cyclovoltammetrie (CV) ist ein elektrochemisches Verfahren zur Analyse von Redoxprozessen und deren Kinetik oder Thermodynamik. An der stationären Arbeitselektrode, welche sich in einem Elektrolyten befindet, wird ein Potential angelegt, das sich in einer Sägezahnfunktion linear mit der Zeit ändert. Das Potential wird relativ zu einer Referenzelektrode gemessen. Simultan mit dem sägezahnförmigen Potential-Zeit-Verlaufs wird ein Strom-Potential-Diagramm aufgenommen.

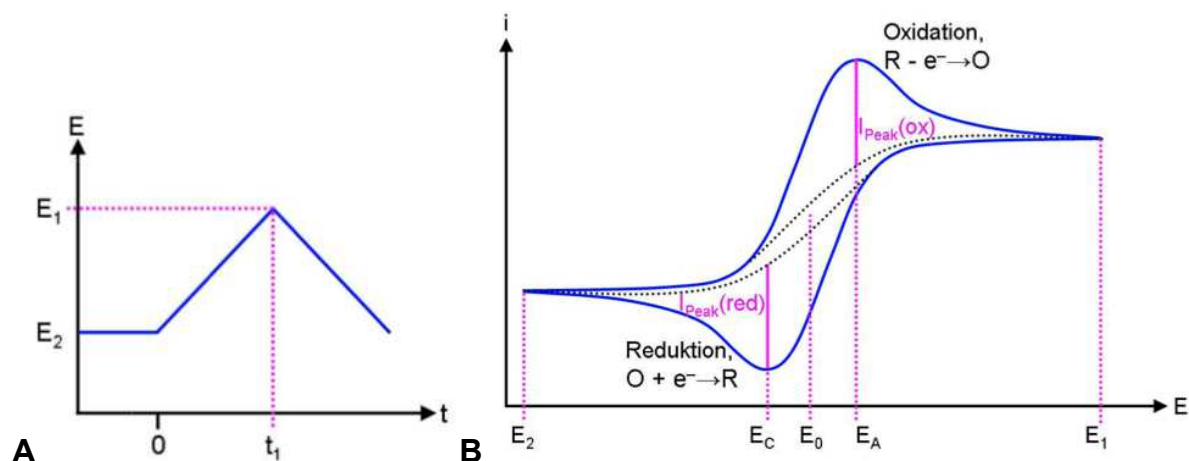


Abbildung 1.13: Abbildung A zeigt den zeitlichen Verlauf des Potentials während eines Cyclovoltammetriescans. Das Potential wird in Sägezahnform zwischen den zwei Umkehrpotentialen (E_1 und E_2) verändert. Abbildung B zeigt das resultierende Cyclovoltammogramm. E_C und E_A zeigen die Peak-Potentiale des Reduktions- und Oxidationsvorgangs, $E^0 = \frac{(E_C + E_A)}{2}$ entspricht dem Standardredoxpotential eines reversiblen Redoxpaares [16].

Der redoxaktive Stoff wird abhängig vom angelegten Potential oxidiert oder reduziert.



Das Potential wird sägezahnförmig verändert mit den Umkehrpotentialen ($E_1 > E^0$ und $E_2 < E^0$). Bei der Veränderung des Potentials in positive Richtung wird der redoxaktive Stoff oxidiert und es fließt ein anodischer Strom. Bei Veränderung des Potentials in negative Richtung wird der redoxaktive Stoff reduziert und es fließt ein kathodischer Strom.

Die gemessenen Ströme eines Cyclovoltammogramms bestehen aus nicht-faradayschen Strömen, welche aufgrund von Reorganisation der Ionen an der Grenzfläche entstehen und aus faradayschen Strömen, welche durch die Reduktion und Oxidation von redox-aktiven Stoffen entstehen. Bei Letzteren kommt es zu einem heterogenen Ladungstransfer zwischen der Elektrode und dem redoxaktiven Stoff. Die Kinetik dieses Prozesses bestimmt die Kurvenform des Voltammogramms, wobei der anodische (E_a) und kathodische Peak (E_c) – im Falle von gelösten

Redoxpaaren – durch den diffusionsbedingten Massentransfer gegeneinander verschoben sind.

Der Vorgang an der Elektrode wird wie folgt beschrieben: Aufgrund des Ansteigens des Potentials kommt es zur Abnahme der Oberflächenkonzentration der reduzierten Spezies R und zur Zunahme der oxidierten Spezies O. Bei Erreichen von E_a , dem Peakpotential der reduzierten Spezies, erreicht der Strom ein Maximum. In weiterer Folge kommt es durch die Ausdehnung der Diffusionsschicht zu einer Abnahme des Konzentrationsgradienten und somit zu einer Abnahme des Stroms. Analoges gilt für das Absinken des Potentials. Dabei kommt es zur Verarmung der Spezies O und Erhöhung der Spezies R.

Im Falle von Redoxpaaren, die an einer Oberfläche immobilisiert sind liegen dagegen die Peakpotentiale aufgrund des fehlenden Massentransportes auf der Potentialachse genau gegenüber [41].

2. Materialien und Methoden

2.1. Probenpräparation

Der polierte Siliziumkristall wurde in 10%-iger ethanolischer MPTES-Lösung funktionalisiert und mit Ethanol gespült. Nach Temperierung für 1h bei 100°C wurde der Kristall für 10 Minuten in Wasser getaucht. Mittels elektrothermischer Bedampfung wurde eine 30 nm dicke Goldschicht aufgedampft. Für die Herstellung der strukturierten Oberfläche, wurden die Kristalle in 50 ml einer wässrigen Hydroxylamin Hydrochlorid (0.4 mM) Lösung fünf mal in Abständen von zwei Minuten mit jeweils 500 µl einer wässrigen Gold(III)-Chlorid Hydrat (0.3 mM) Lösung versetzt und anschließend mit Wasser gespült.

2.2. Immobilisation von Cytochrom c Oxidase und Bildung der künstlichen Lipidmembran

Der so vorbereitete Kristall wurde für 20h in einer Lösung, bestehend aus 3 mM DTNTA und 7 mM DTP in DMSO (Dimethylsulfoxid) inkubiert. Anschließend wurde der Kristall für 30min in einer NiCl_2 Lösung in Acetatpuffer (50 mM, pH 5,5) inkubiert und mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Cytochrom c Oxidase wurde in einem DDM Phosphatpuffer (0,05 M K_2HPO_4 , 0,1 M KCl, pH 8, 0.1% DDM) in einer Konzentration von 100 nM an der Goldoberfläche immobilisiert. Nach 4h Immobilisierungszeit wurde die Zelle mit DDM Phosphatpuffer gewaschen und 40 µM DiPhyPC in DDM Phosphatpuffer hinzugefügt. Durch die Zugabe von Biobeads wurde die in-situ Dialyse in Gang gesetzt und das Detergens (DDM) entfernt.

2.3. Aktivierung der CcO mittels Cyclovoltammetrie

Für die Aktivierung der Cytochrom *c* Oxidase wurde der Probenraum der Messzelle mittels O₂-gesättigtem (26 mg/l), auf 28°C temperierten PBS Puffer (0.05 M K₂HPO₄, 0.1 M KCl, pH 8) mit einer Flussgeschwindigkeit von 200 µl/min gespült.

Die Messungen wurden mittels Autolab PGSTAT12 und dem Programm GPES 4.9 (Metrohm, Herisau, Schweiz) durchgeführt. Eine Ag|AgCl, KCl_{sat} Elektrode wurde als Referenzelektrode und ein Platindraht als Gegenelektrode benutzt. Als Umkehrpotentiale wurden -800 mV und +600 mV vs. SHE und 50 mV/s als Vorschubgeschwindigkeit gewählt.

Eine Folge von Cyclovoltammogrammen wurde so lange gemessen bis die Peaks bezüglich Position und Höhe konstant blieben.

2.4. Elektrochemisch-modulierte tr-ATR-SEIRAS

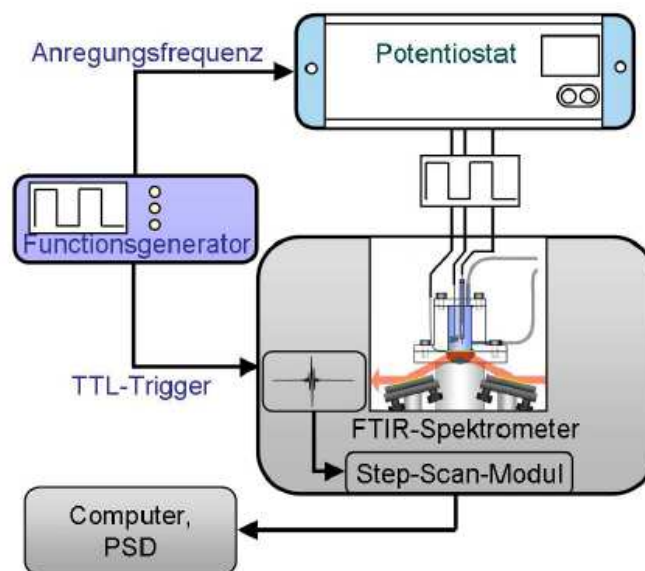


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau der Messapparatur. Ein Funktionsgenerator synchronisiert den Potentiostaten mit dem IR-Spektrometer. Der Potentiostat steuert die angelegten Potentiale in der Zelle. Das IR-Spektrometer erhält vom Funktionsgenerator den Trigger zum Starten der Step-Scan-Messung [16].

Die IR-Messungen wurden auf einem Vertex 70v Infrarotspektrometer (Bruker, Ettlingen, Deutschland) durchgeführt. Der IR-Strahl wird in einem Winkel von 60° in den Kristall geleitet und dort einmal reflektiert. Die Intensität des Strahls wurde mittels eines Quecksilber Cadmium Tellurit (MCT) Detektors gemessen. Aufgrund der geringen Intensitäten wurde das Interferogramm beidseitig gemessen und mittels Power Phase Correction Mode in Absorbanzen umgewandelt. Als spektrale Auflösung wurde 4 cm⁻¹ gewählt. Die Anzahl der notwendigen Interferogrammpunkte wurde durch einsetzen eines optischen Filters auf 2842 Datenpunkte verringert. Alle Step-Scan Messungen wurden mit der Software OPUS 7.0 von Bruker durchgeführt.

Der Funktionsgenerator (Agilent 33250A, Santa Clara, CA, USA) generierte die Rechtecksfunktion für die modulierte Anregung und liefert das Signal zur Synchronisation des Potentiostaten mit dem Spektrometer (Abb. 2.1). Der Potentiostat steuerte die periodisch angelegten Potentiale zur Oxidation (+400 mV) und Reduktion (-800 mV) der CcO. Die positive oxidative Flanke ist dabei der Trigger für die tr-FTIR-Messung (Abb. 2.2).

Für alle Messungen wurde eine fixe Anzahl von 50 Timeslides (i.e. Spektren) festgelegt. Die Absorbanz (A_λ) der Differenzialspektren wurde mittels Absorbance-Makro von OPUS über die Formel 2.1 berechnet. Als Referenz (I_0) wurde das Spektrum des vollständig reduzierten Enzyms gewählt.

$$A_\lambda = -\log \left(\frac{I_1}{I_0} \right) \quad 2.1$$

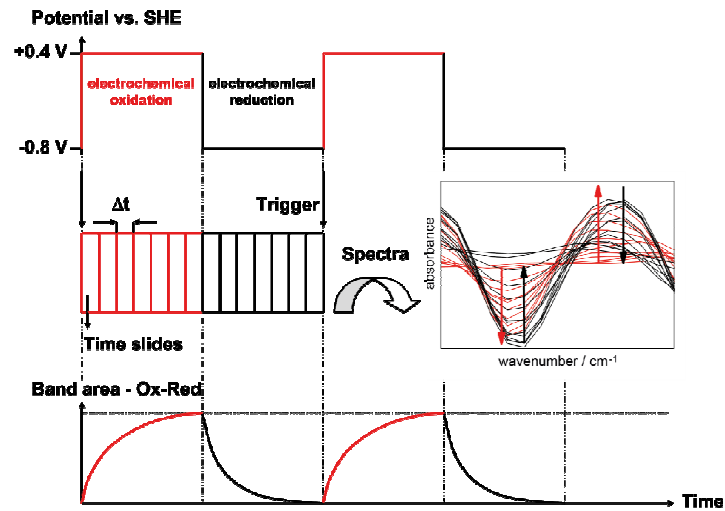


Abbildung 2.2: Durch elektrochemische Anregung wird das Enzym periodisch oxidiert und reduziert. Während des Ablaufs werden 50 IR-Spektren aufgenommen. Durch Integration der Banden und Auftragen gegen die Zeit ergibt sich eine exponentielle ansteigende und abfallende Kurve.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Immobilisierung und Aktivierung der CcO

3.1.1. CcO Anbindung unter SEIRAS-Beobachtung

Die Anbindung der Cytochrom *c* Oxidase von *Rhodobacter sphaeroides* an die Goldoberfläche wurde durch Aufnahme von SEIRA-Spektren in Zeitabständen von 20 min nach der Zugabe der CcO verfolgt.

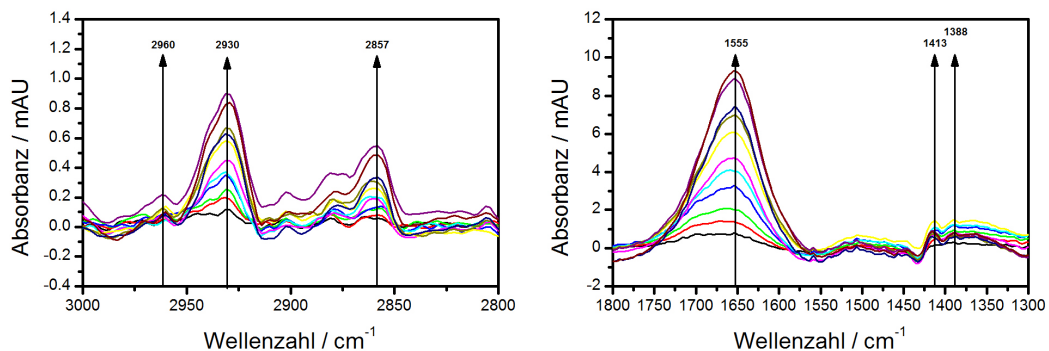


Abbildung 3.1: SEIRA-Spektren während der Anbindung von CcO an der Goldoberfläche.

Die stärkste Bande wurde bei 1555 cm^{-1} beobachtet. Diese Bande wurde als Amid I Bande identifiziert und kann den CO-NH Schwingungen der helikalen Strukturen zugeordnet werden. Die Bande bei 1413 cm^{-1} kann auf die Veränderung der NTA-Struktur zugeordnet werden. Im höheren Wellenzahlbereich konnte der Abfall der symmetrischen Methyl-Streckschwingungen bei 2960 cm^{-1} , der asymmetrischen Methylen-Streckschwingungen bei 2930 cm^{-1} und symmetrischen Methylen-Streckschwingungen 2857 cm^{-1} beobachtet werden. Diese werden den CH-Schwingungen der Protein-Grundstruktur zugeordnet [36]. Es konnte keine Amid II oder Amid III Bande gefunden werden.

3.1.2. Membranbildung

Die Dialyse und Membranbildung wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. In früheren Publikationen wurden diese ausführlich beschrieben [33, 52-54].

3.1.3. Aktivierung der Cytochrom c Oxidase

Die Aktivierung der Cytochrom c Oxidase wurde im Verlauf mehrerer aufeinander folgender Cyclovoltammetrie-Scans durchgeführt. Dabei wurde der Strom in Abhängigkeit vom Potential zwischen den beiden Umkehrpotentialen -800 mV und +600 mV (gegen SHE) aufgezeichnet.

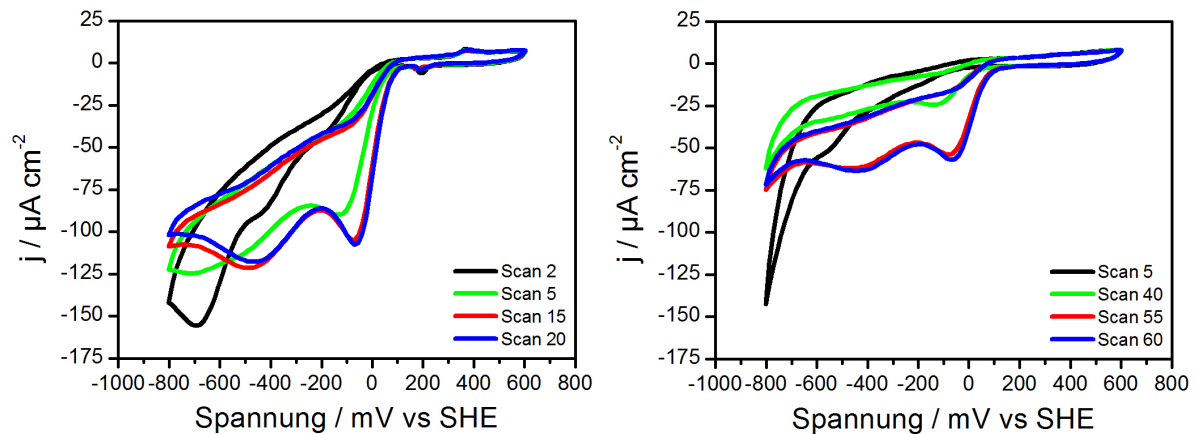


Abbildung 3.2: Cyclovoltammogramme von der Charge FM12 (links) und der Charge FM11 (rechts; unpublizierte Daten zur Verfügung gestellt von Andreas Schwaighofer) nach unterschiedlicher Anzahl an Scans. Die Aktivierung ist durch das Absinken der Bande bei -50mV erkennbar.

Die der Aktivierung zeigt sich durch Veränderung des Cyclovoltammogramms im Verlauf einer bestimmten Anzahl von Scans. Es kommt zur Ausbildung zweier Peaks, welche sich mit steigender Scanzahl verändern (Abb. 3.2.). Die schwarzen Kurven (Scan Nr. 2 bzw. 5) zeigen die Peaks bei etwa -500 und -700 mV, die auf die Reduktion von jeweils Sauerstoff zu Peroxid und Wasser verantwortlich sind. Diese verschieben sich mit steigender Scan-Anzahl zu positiveren Potentialen bis sie bei

-55 und -450 mV konstant bleiben. Diese Banden wurden dem Elektronentransfer zur CcO (-50 mV) und Protonentransfer der gepumpten Protonen (-450 mV) zugeordnet [33, 52]. Sobald der Stromfluss als auch Potential der Banden konstant blieben wurde die Messung beendet und das Protein gilt als aktiviert. Die Anzahl der Scans, bei dem dieser Zustand erreicht ist, hängt stark von der Proteincharge ab. In dieser Arbeit wurde die Charge FM 12 verwendet, die nach 20 Scans bereits völlig aktiviert war. Zum Vergleich ist hier die Charge FM 11 gezeigt, die 60 Scans zur vollständigen Aktivierung benötigte. Die beiden Chargen unterscheiden sich außerdem in der Höhe der Stromdichte, die im aktivierten Zustand erreicht wurde. Für den Protonentransfer liegt diese bei FM12 bei $120 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und bei FM11 bei $60 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, für den Elektronentransfer bei $106 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ bei FM12 und $56 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ bei FM11.

3.1.4. Conclusio von 3.1

Für die Unterschiede in der Aktivierungszeit der Chargen konnte keine Erklärung gefunden werden. Allerdings besteht die Vermutung dass die Aufreinigung des Proteins eine entscheidende Rolle dabei spielt. Ferguson-Miller berichtete schon 1998, dass es durch den Einsatz von Imidazol als Elutionsmittel teilweise zum Austausch von Fe gegen Imidazol am Häm a kommt. Um dem entgegen zu wirken wurde Histidin, welches größer ist, eingesetzt [13]. Eine weitere Möglichkeit ist die Anwesenheit von Lipiden, die während der Aufreinigung im Protein blieben und somit die Funktion des Enzyms verbessern. Die Bedeutung dieser Lipide konnte durch Qin et al. gezeigt werden [55, 56]. In der Literatur wird auch eine geringe inhibitorische Wirkung von DDM auf die CcO-Aktivität aufgrund einer Konkurrenzreaktion mit anderen Lipiden an der Steroidbindungsstelle beschrieben [57].

3.2. Anaerobe EC modulierte Step Scan Messung

Anaerobe Bedingungen wurden durch Spülen des PBS-Puffers mit Argon erreicht. Nach 20 Minuten wurden 0.3% Glucose, Glucose-Oxidase (75 µg/ml) und Katalase (12.5 µg/ml) hinzugefügt um den verbleibenden Sauerstoff aus dem Puffer zu entfernen.

Die Anzahl der Messwiederholungen wurde so gewählt dass die Messdauer 90 Minuten nicht überschreitet um eine Beschädigung der TLGS-Oberfläche oder des Enzyms zu verhindern. Die Potentiale wurden als Rechtecksfunktion von -800 mV bis +400 mV vs. SHE angelegt.

3.2.1. Optimierung der Packungsdichte

In Vorversuchen wurde zur Optimierung der Packungsdichte verschiedene Mischungsverhältnisse von DTNTA:DTP ausgetestet. Hierfür wurden ATR-Kristalle mit DTNTA-DTP-Lösungen mit je 10%, 20%, 30%, 40% und 50% DTNTA funktionalisiert und tr-SEIRA-Messungen mit einer Anregungsfrequenz von 100Hz durchgeführt.

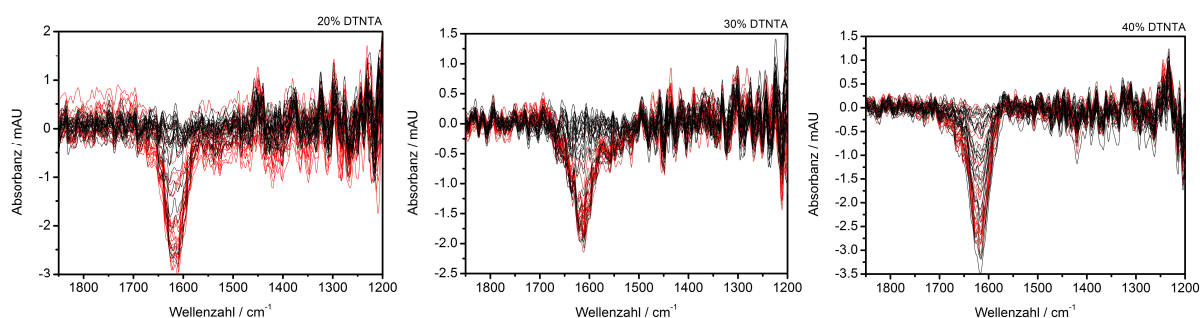


Abbildung 3.3: Zeitaufgelöste Spektren von CcO bei einer Anregungsfrequenz von 100Hz unter anaeroben Bedingungen mit unterschiedlicher DTNTA-Konzentration (20%, 30% und 40%). Die roten Spektren wurden während der elektrochemischen Oxidation, die schwarzen während der elektrochemischen Reduktion aufgenommen.

Die prominenteste Bande in den zeitaufgelösten IR-Spektren ist eine gut sichtbare Amid I Bande im Bereich von 1550-1700 cm⁻¹. Die Konzentration von 30% DTNTA

lieferte sowohl im Amid I Bereich als auch im Fingerprint das beste SNR. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem mittels Impedanzspektroskopie [33] bestimmten optimalen Verhältnis.

3.2.2. Optimierung der Anregungsfrequenz

Zur weiteren Optimierung der Spektrqualität wurden verschiedene Anregungsfrequenzen (20, 50, 100 und 250 Hz) getestet.

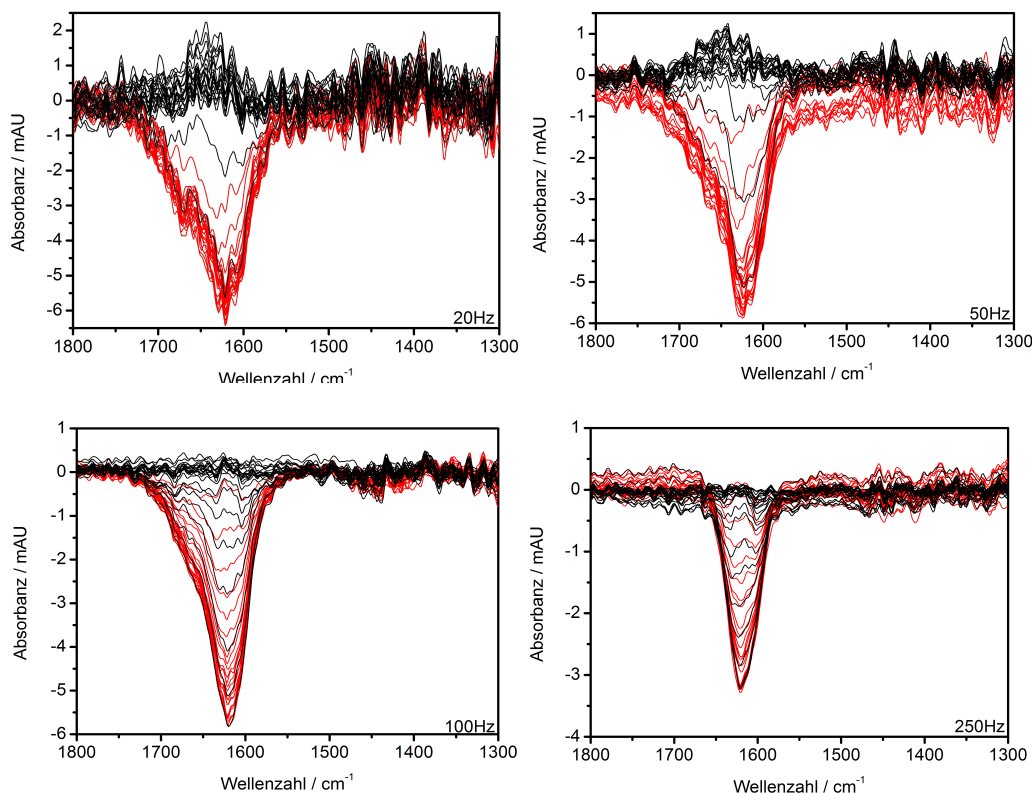


Abbildung 3.4: Zeitaufgelöste Absorptionsspektren unter anaeroben Bedingungen bei den Anregungsfrequenzen 20, 50, 100 und 250Hz.

Die Amid I Bande der zeitaufgelösten Absorptionsspektren ist bei allen Frequenzen gut sichtbar und Intensität ist bei den Frequenzen 20, 50 und 100 Hz gleich, bei 250 Hz ist sie geringer. Das SNR-Verhältnis verbessert sich mit steigender

Anregungsfrequenz. Das Absorptionsmaximum befindet sich bei ca. 1620 cm^{-1} , welche typisch für β -Sheets ist.

Um ein genaueres Bild von der Qualität der Messungen zu erhalten war es notwendig, die Amid I Bande in dessen einzelne Komponenten aufzutrennen. Dies wurde mittels Parametern aus einer zuvor durchgeführten PSD-Analyse, wie im Kapitel 3.2.3 beschrieben durchgeführt.

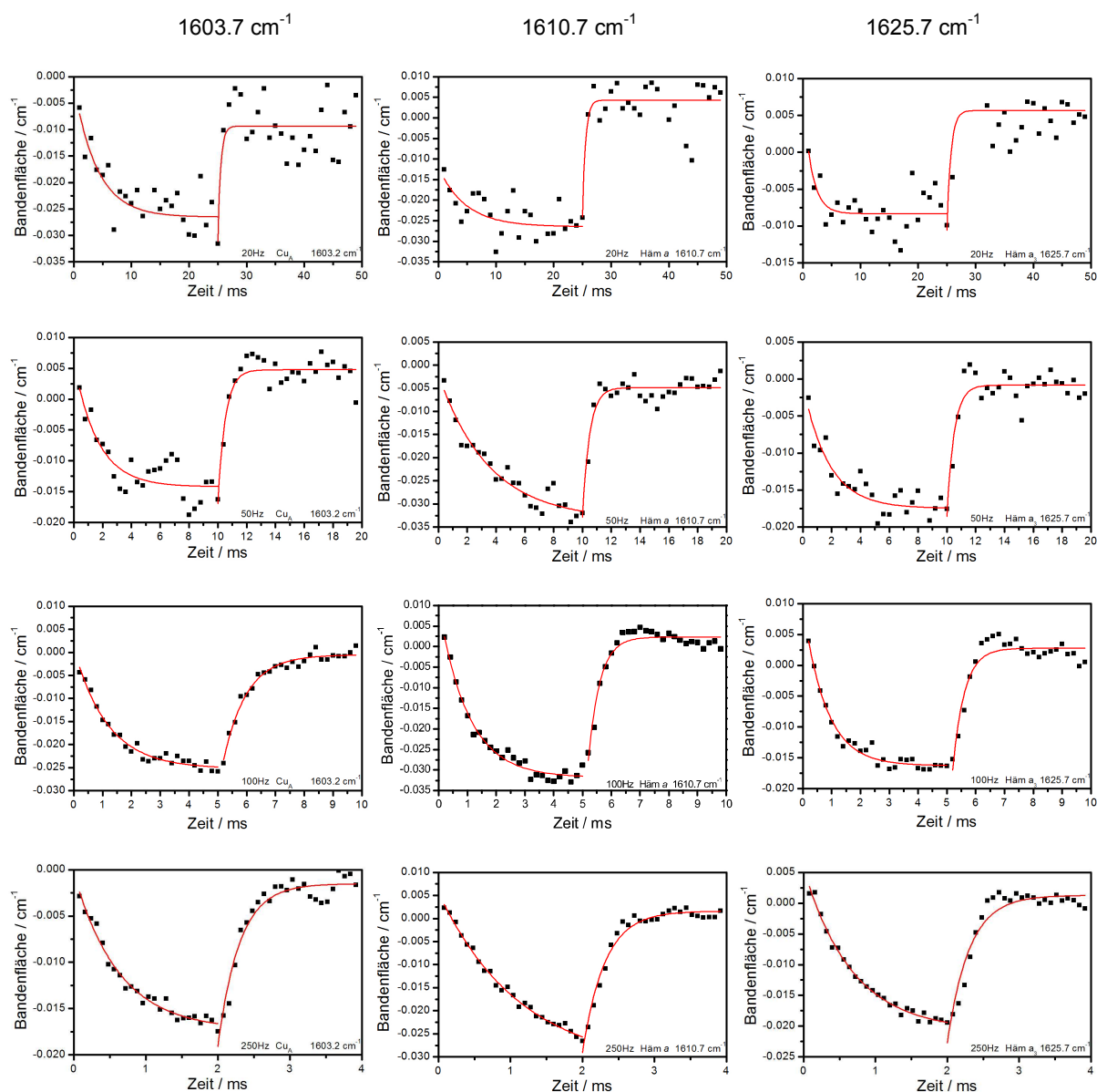


Abbildung 3.5: Die Bandenfläche von Cu_A (1603.2 cm^{-1}), Häm a (1610.7 cm^{-1}) und Häm a_3 (1625.7 cm^{-1}) bei den Anregungsfrequenzen von 20, 50, 100 und 250 Hz wurde gegen die Zeit aufgetragen.

Bei der Mehrzahl der Anregungsfrequenzen kam es zu einer Sättigungskurve der Bandenfläche. Dass heißt, dass die Bande sich ab einem gewissen Zeitpunkt nicht mehr verändert bzw. die Reaktion abgeschlossen ist. Die Bandenflächen von den Messungen bei 20 und 50 Hz streuen stark. Bei den Messungen von 100 und 250 Hz können die Daten gut durch eine exponentielle Funktion beschrieben werden. Des Weiteren ist bei der Oxidation und Reduktion (1. und 2. Halbperiode der Modulation) eine Veränderung der Sättigungskurve mit der Erhöhung der Anregungsfrequenz beobachtbar.

Aus diesen Messungen ergab sich das Optimum für die Step-Scan Messung bei 100 Hz.

3.2.3. Auftrennung der Amid I Bande

Es wurde eine tr-SEIRA-Messung bei 100 Hz durchgeführt und die Amid I Bande genauer untersucht.

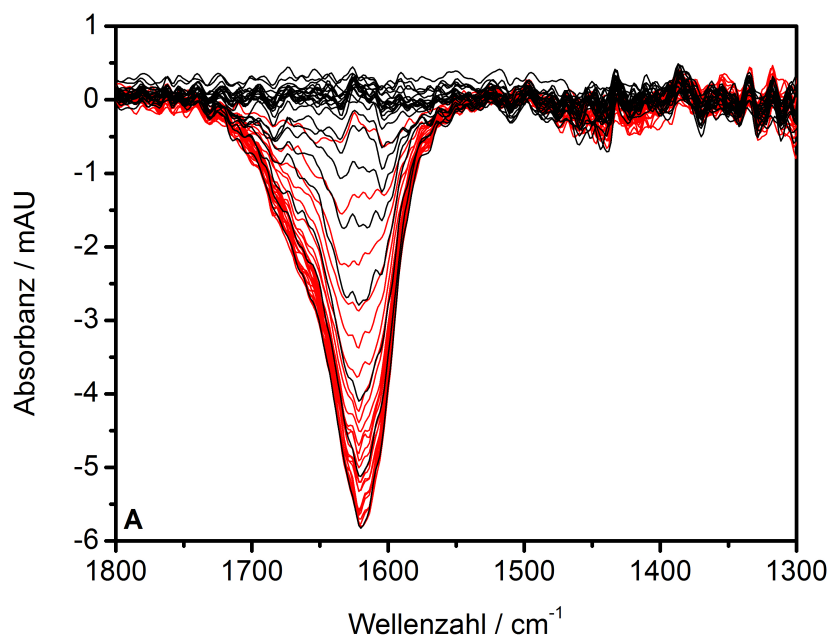
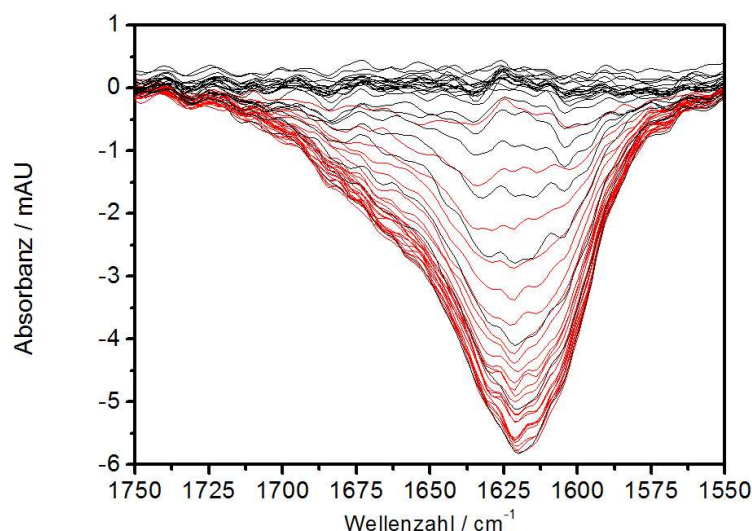


Abbildung 3.6: tr-SEIRA Spektren, aufgenommen bei einer Anregungsfrequenz von 100 Hz und anaeroben Puffer und pH 8.



3.7: Amid I Region von tr-SEIRA Spektren bei einer Anregungsfrequenz von 100 Hz.

Die Auftrennung der Amid I Bande wurde mittels PSD unter Verwendung der von Schweighofer et al. [58] (Tabelle 4) ermittelten Parameter durchgeführt. Die Bandenposition, Halbwertsbreite (FWHM = full width at half maximum) und die Intensität wurden angepasst. Als Bandenform wurde die Lorentzkurve gewählt.

Tabelle 4: Bandenposition und Halbwertsbreite, erhalten aus der PSD-Analyse [58].

Bandenposition	FWHM	Redoxzentrum	Sekundärstruktur
1591.3	6.2	Cu _A	-
1596.5	13.4	Häm a	His
1603.2	11.3	Cu _A	-
1610.7	11.7	Häm a	β-Sheet
1615.2	8.1	-	—
1619.9	9.1	Häm a ₃ Häm a/Häm a ₃	β-Sheet
1625.7	8.0	Häm a ₃	β-Sheet
1643.0	80.0	H ₂ O	-
1647.7	10.1	Cu _A	α-Helix
1653.3	8.0	Häm a ₃ Häm a ₃	α-Helix
1662.2	16.4	Häm a/Häm a ₃	α-Helix / β-turn
1690.4	10.3	Cu _A	β-Sheet

Mittels Fit-Makro von OPUS wurden die Absorptionsspektren mittels der oben genannten Parameter analysiert und die darin enthaltenen Banden isoliert.

Die erhaltenen Integrale werden genutzt um mit Hilfe der Gl. 3.1 die einzelnen Banden zu berechnen. (A = Integral, ω = FWHM, x_0 = Bandenposition):

$$y = \frac{2A}{\pi} \cdot \frac{\omega}{4 \cdot (x - x_c)^2 + \omega^2} \quad 3.1$$

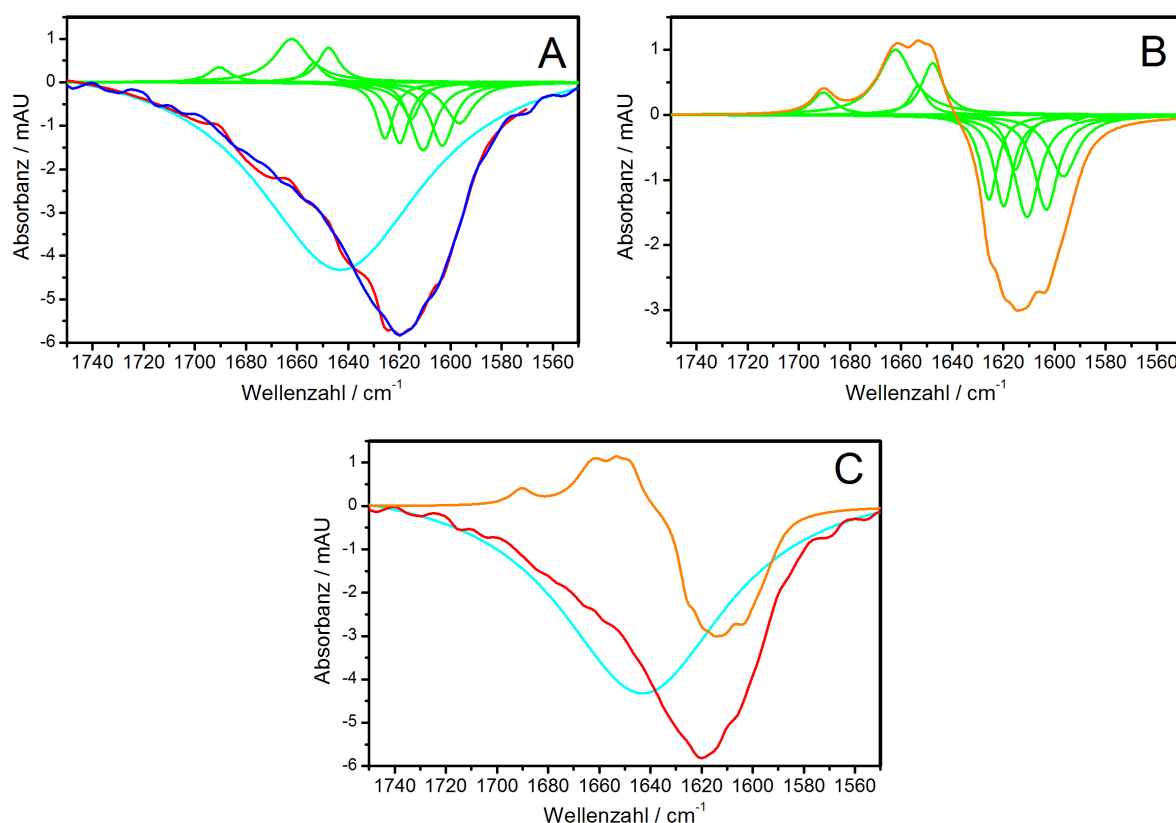


Abbildung 3.8: Auftrennung der Amid I Bande in einzelne Komponenten. Abbildung A zeigt die aufgetrennten Banden (grün), das gefittete Spektrum (blau) und das gemessene Absorptionsspektrum (rot). Abbildung B zeigt die aufgetrennten Banden (grün) ohne der Wasserbande und das aus der Summe dieser Banden resultierende Spektrum (orange). Abbildung C zeigt die Summe deraufgetrennten Banden (orange) ohne Wasser (hellblau) und das gemessene Absorptionsspektrum (rot).

Dabei zeigt sich, dass die Wasserbande einen Großteil der Amid I Bande ausmacht. Nachdem die Wasserbande von dem Spektrum abgezogen wurde, konnten mehrere positive und negative Banden des Proteins identifiziert werden. Die meisten dieser Banden konnten bereits in früheren Publikationen gefunden werden [35, 59, 60].

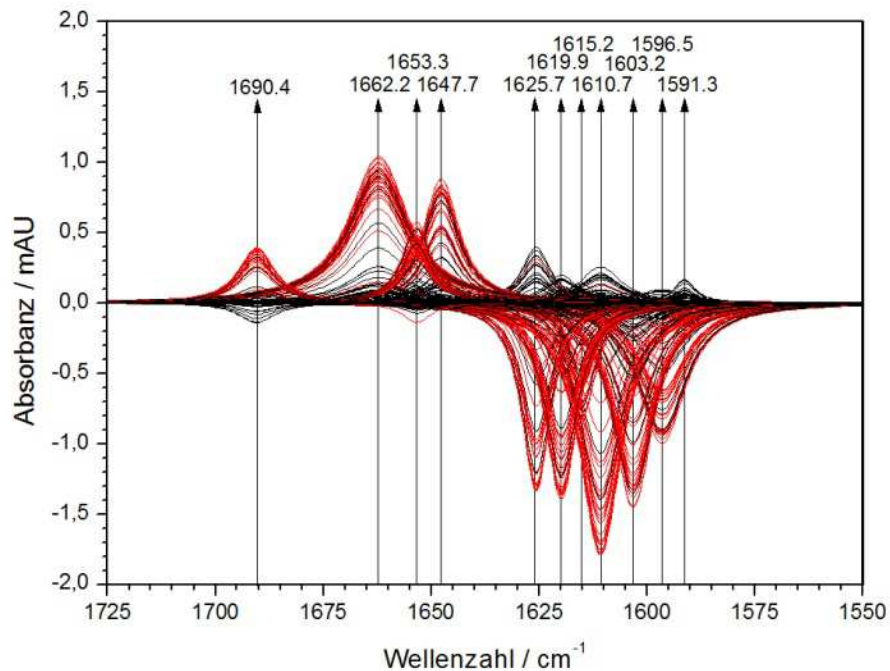


Abbildung 3.9: Aufgetrennte Banden (ohne Wasserbande) aus den tr-SEIRA Spektren, aufgenommen bei einer Anregungsfrequenz von 100Hz und pH 8. Schwarze Banden wurden während der Reduktion, rote während der Oxidation gemessen.

Die Fläche der einzelnen Banden wurde gegen die Zeit aufgetragen. Diese zeitabhängigen Absorptionen in Abbildung 3.10 zeigten den Verlauf der Reaktion in den beiden Halbperioden, wobei das Enzym in der ersten Halbperiode elektrochemisch oxidiert, in der zweiten elektrochemisch reduziert wird.

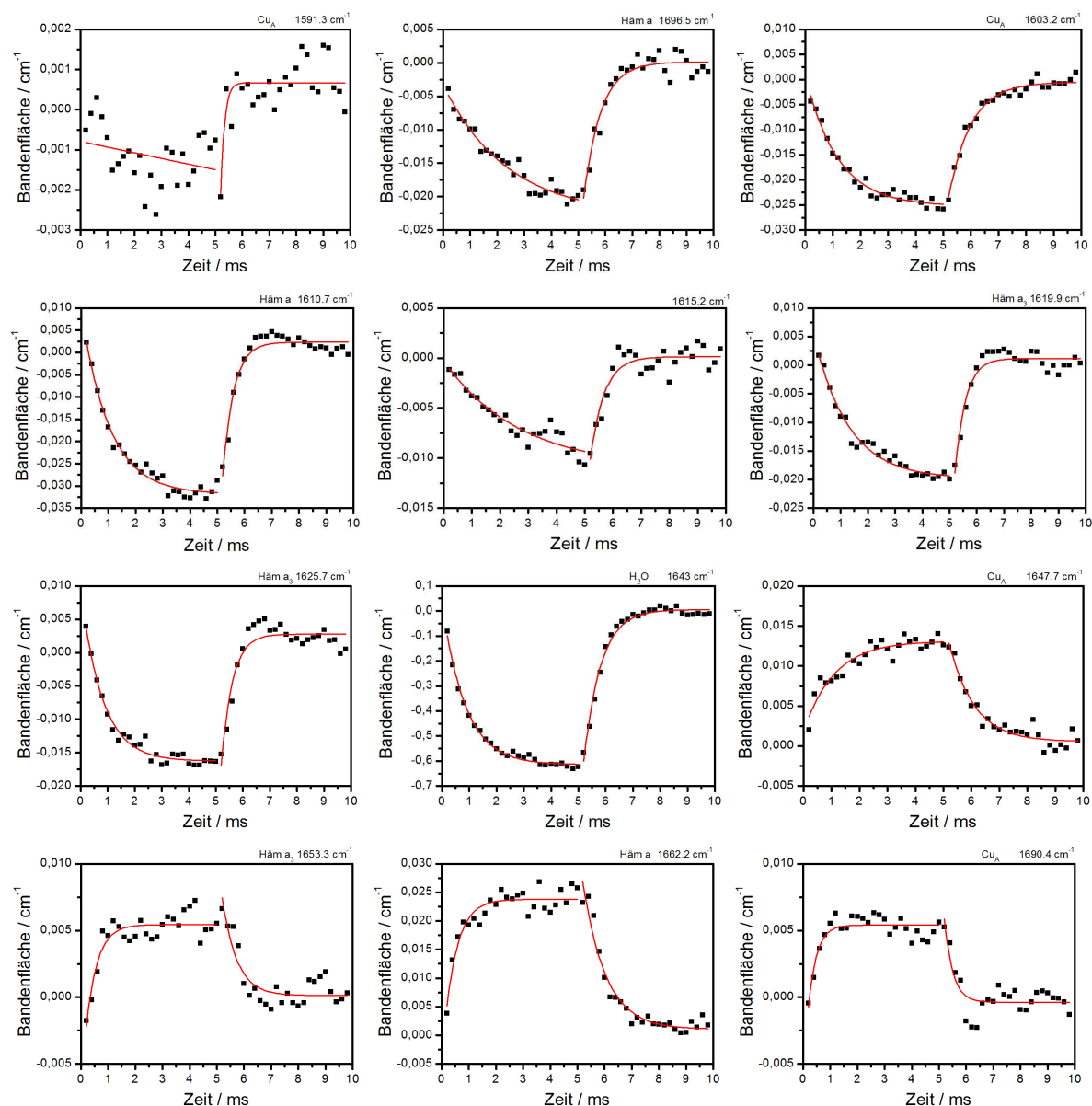


Abbildung 3.10: Die Bandenfläche verschiedener Banden wurde gegen die Zeit aufgetragen. Die erste Halperiode wird das Enzym oxidiert, in der zweiten reduziert. Die Messung erfolgte anaerob bei einer Anregungsfrequenz von 100 Hz.

Wird die Absorbanz gegen die Zeit aufgetragen zeigt sich, dass sich die meisten gefundenen Banden gut durch eine exponentielle Funktion beschreiben lassen, wobei die Streuung der Datenpunkte auf 0.05 mAU geschätzt wurde. Ebenso lässt sich erkennen dass die Banden immer zu ihrem Ausgangswert zurückkehren was auf eine Reversibilität des Prozesses hindeutet.

Abbildung 3.11 zeigt eine 3D-Darstellung der in Abb. 3.9 gezeigten Spektren in Abhängigkeit von der Zeit. Es lassen sich sehr gut die großen Konformationsänderungen beobachten. Die β -Sheets im Bereich $1550\text{-}1625\text{ cm}^{-1}$ zeigen die größte Absorbanzänderung. Die Veränderung der α -Helices im Bereich von $1647\text{-}1662\text{ cm}^{-1}$ ist geringer aber dennoch gut sichtbar.

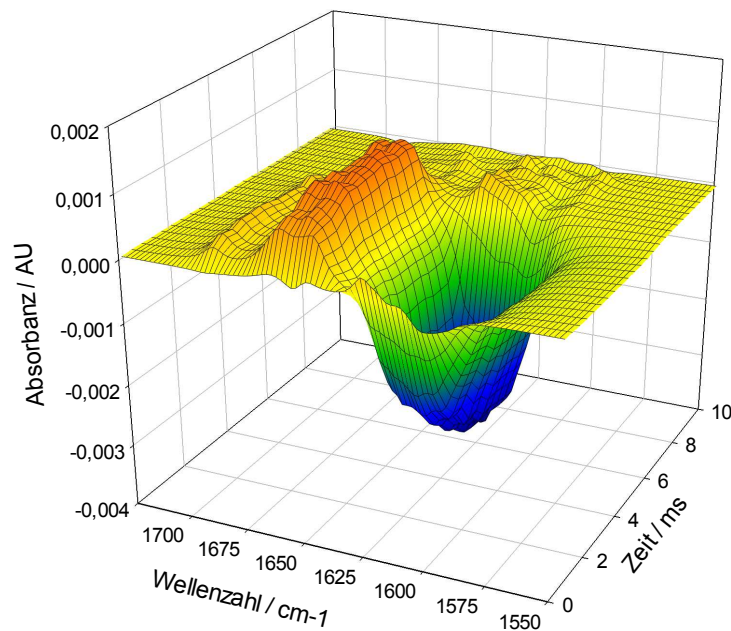


Abbildung 3.11: 3D-Graph der aufgelösten Banden (ohne Wasserbande) des Amid I Bereichs, aufgenommen bei einer Anregungsfrequenz von 100Hz und anaeroben Bedingungen. In den ersten 5 ms wird das Enzym oxidiert, in den nächsten 5ms reduziert. Gut sichtbar sind die großen Absorbanzveränderungen der Sekundärstrukturen. Die Absorbanz der meisten β -Sheet-Banden sinkt während die der α -Helices steigt.

3.2.4. Fingerprintbereich

Die Banden einzelner Aminosäuren befinden sich u.a. im Fingerprintbereich (1300-1550 cm^{-1}).

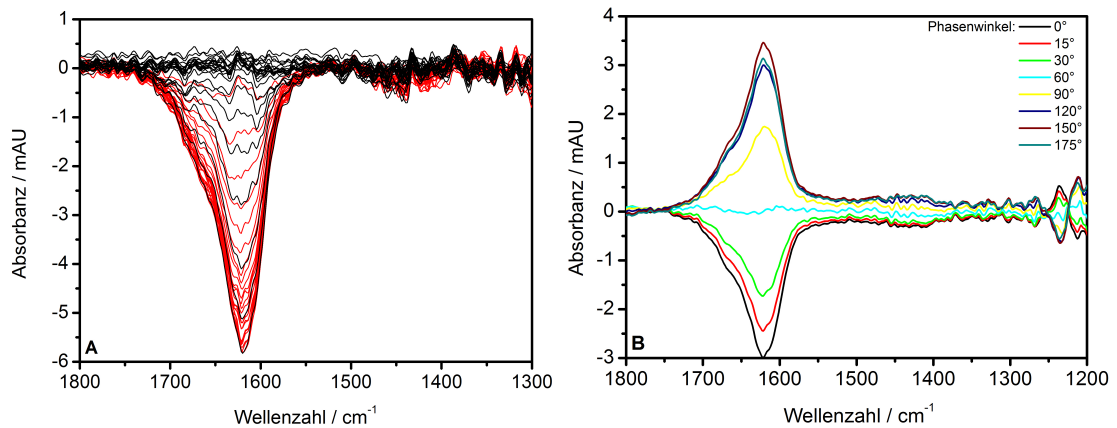


Abbildung 3.12: tr-SEIRA Spektren (A) und phasenaufgelöste Spektren (B) bei einer Anregungsfrequenz von 100Hz unter anaeroben Bedingungen und pH 8.

Zum Auffinden der Aminosäurebanden wurde der Fingerprintbereich von sechs Messungen mit unterschiedlichen Anregungsfrequenzen (20, 50, 100 und 250 Hz) untersucht. Zum Vergleich dienten auch phasenaufgelöste Spektren.

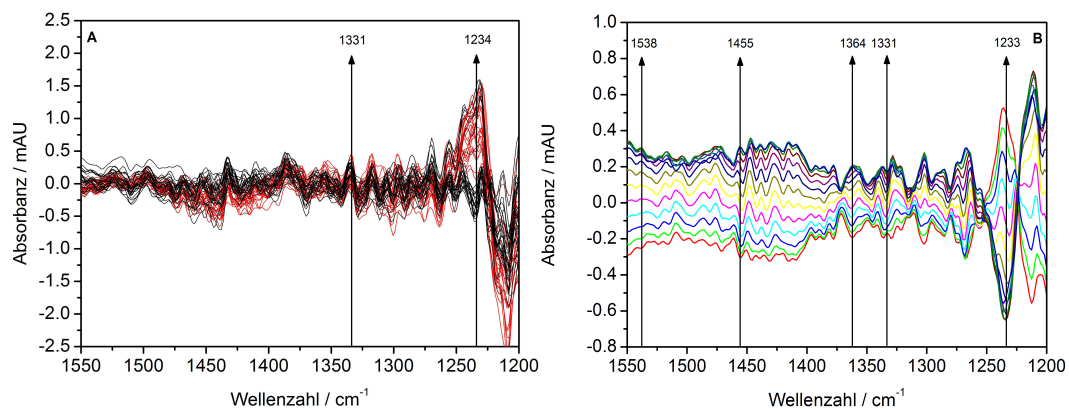


Abbildung 3.13: Fingerprintbereich von tr-SEIRA Spektren (A) und phasenaufgelöste Spektren (B) bei einer Anregungsfrequenz von 100Hz unter anaeroben Bedingungen und pH 8.

Es konnten einige Banden sowohl in den Absorptionsspektren als auch in den phasenaufgelösten Spektren gefunden werden (Tabelle 5). Aber aufgrund der geringen Intensität und dem starken Rauschen konnte die Zeitabhängigkeit jedoch nicht analysiert werden. Anhand von Abb. 3.12 und Tabelle 5 zeigt sich die Verteilung der Banden in den verschiedenen Spektren.

Tabelle 5: Mehrfach gefundene Banden im Fingerprintbereich von 6 tr-FTIR- und phasenaufgelösten Spektren.

Absorptionsspektren [cm^{-1}]						Phasenaufgelöste Spektren [cm^{-1}]					
1211			1211	1212	1213	1212	1212			1212	1211
	1236		1234	1234	1234	1232	1233				1233
	1256		1257	1255					1255	1255	
			1268	1269		1268	1268			1268	1268
1273		1272						1273	1274		1273
1285	1286	1286					1286		1285	1285	
	1296			1297		1297				1296	
1299		1300	1300		1299	1301		1300			1299
	1326			1328		1326				1328	1327
		1359			1361		1361	1360	1362	1361	1362
1538	1535	1538	1538		1535		1538			1538	

Die so identifizierten Banden wurden Redoxzentren und Schwingungen zugeordnet.

Tabelle 6: Zuordnung der gefundenen Banden im Fingerprintbereich von tr-FTIR- und phasenaufgelösten Spektren

Absorptionsspektren [cm^{-1}]	Phasenaufgelöste Spektren [cm^{-1}]	Literatur [cm^{-1}]	Zuordnung
1235	1233	1240	C-O Streckschwingung [36]
1334	1331	1332	Cu_B [61]
1359	1362	1364	Häm [59]
1457	1454	1455	Cu_B [61]
1538	1538	1537	Häm a [62]

Eine Charakteristik der zeitaufgelösten Absorptionsspektren ist die vergleichsweise geringe Intensität der Banden im Fingerprintbereich im Gegensatz zum Amid I Bereich. Trotz des geringen SNR konnten einige Banden gefunden und zugeordnet werden. Dennoch zeigte sich, dass nicht alle Banden in jedem Spektrum gefunden werden konnten (Tabelle 5; Abbildung 3.13)

3.2.5. Auswertung der Daten

Das kinetische Modell der Cytochrom c Oxidase wird an die Daten angefitet.

Zusätzlich zu dem bisher für die Simulation von Cyclovotammogrammen genutzten erweiterten Modell wurde die Abweichung des effektiven Potentials E_{eff} , welches auf das Proteinvom angelegten Potential E berücksichtigt. Die Abweichung wird durch ein periodisches Laden und Entladen eines RC-Schaltkreises mit Relaxationszeit τ modelliert. ΔE wird mittels der beiden Umkehrpotentiale ($E_{p,1}$ und $E_{p,0}$) berechnet.

$$\Delta E = E_{p,1} - E_{p,0} \quad 3.2$$

$$E_{T/2} = E\left(t = \frac{T}{2}\right) = E_{p,1} - \Delta E \cdot e^{-\frac{T/2}{\tau}} - E_{p,0} \quad 3.3$$

$$E_{eff}(t) = \begin{cases} E_{p,1} - \Delta E \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} & \text{for } 0 \leq t \leq \frac{T}{2} \\ E_{p,0} + E_{T/2} \cdot e^{-\frac{t-T/2}{\tau}} & \text{for } \frac{T}{2} < t \leq T \end{cases} \quad 3.4$$

Entsprechend dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Absorbanz A_i zum Zeitpunkt t und einer mit dem Redoxzentrum i assoziiertem Bande abhängig vom Redoxzustand des Redoxzentrums i .

$$A_i(\bar{\nu}, t) = k_{i,ox}(\bar{\nu})p_{i,ox}(t) + k_{i,red}(\bar{\nu})p_{i,red}(t) = k_{i,ox}(\bar{\nu}) + \Delta A_i(\bar{\nu})p_{i,red}(t) \quad 3.5$$

$$\Delta A_i(\bar{\nu}) = k_{i,red}(\bar{\nu}) - k_{i,ox}(\bar{\nu}) \quad 3.6$$

Dabei sind die Proportionalitätskonstanten $k_{i,ox}$ und $k_{i,red}$ Produkte aus der Konzentration des Proteins, dem molaren Extinktionskoeffizienten und der Schichtdicke.

Da die Absorbanz am Beginn der Potentialveränderung als Referenz genommenen wird verändert sich die Absorbanz entsprechend

$$\Delta A_i(\bar{\nu}, t) = \Delta A_i(\bar{\nu}) \cdot [p_{i,red}(t) - p_{i,red}(0)] + A_{i0}(\bar{\nu}) \quad 3.7$$

$A_{i0}(\bar{\nu})$ wurde als Korrekturfaktor eingeführt, um mögliche Abweichungen von $A_i(\bar{\nu}, 0)$ durch experimentelle Streuung zu korrigieren. Um den Effekt durch das Streuen von A_i bei einzelnen Wellenzahlen zu verringern werden die Bandenflächen bei über alle Wellenzahlen jeder Bande für die Berechnung genutzt.

Bayessche Statistik wird genutzt um einen Parametersatz zu erhalten, welcher am besten mit den gemessenen Daten überein stimmt. Siehe Tabelle 7. Einzelheiten der Auswertung sind in der Masterarbeit von David Hildenbrand (2013) sowie in der Publikation von Schwaighofer et al. [63] beschrieben.

Aufgrund der Unsicherheiten der pH-Abhängigkeit von „Midpoint potentials“ wurden als Parameter für die Auswertung die pH-unabhängigen Standardredoxpotentiale E_{1-4}^0 gewählt. Weitere Parameter sind die pK-Werte der oxidierten pK_{1-4}^o und reduzierten Redoxzentren pK_{1-4}^r . Bei den kinetischen Parameter wurde zwischen dem elektrochemischen Elektronentransfer von der Elektrode zum Cu_A , welches durch eine elektrochemische Geschwindigkeitskonstante k_e beschrieben wird und den chemischen Geschwindigkeitskonstante $k_{l,m}$ bei Reaktionen zwischen zwei aufeinanderfolgenden Reaktionszentren unterschieden.

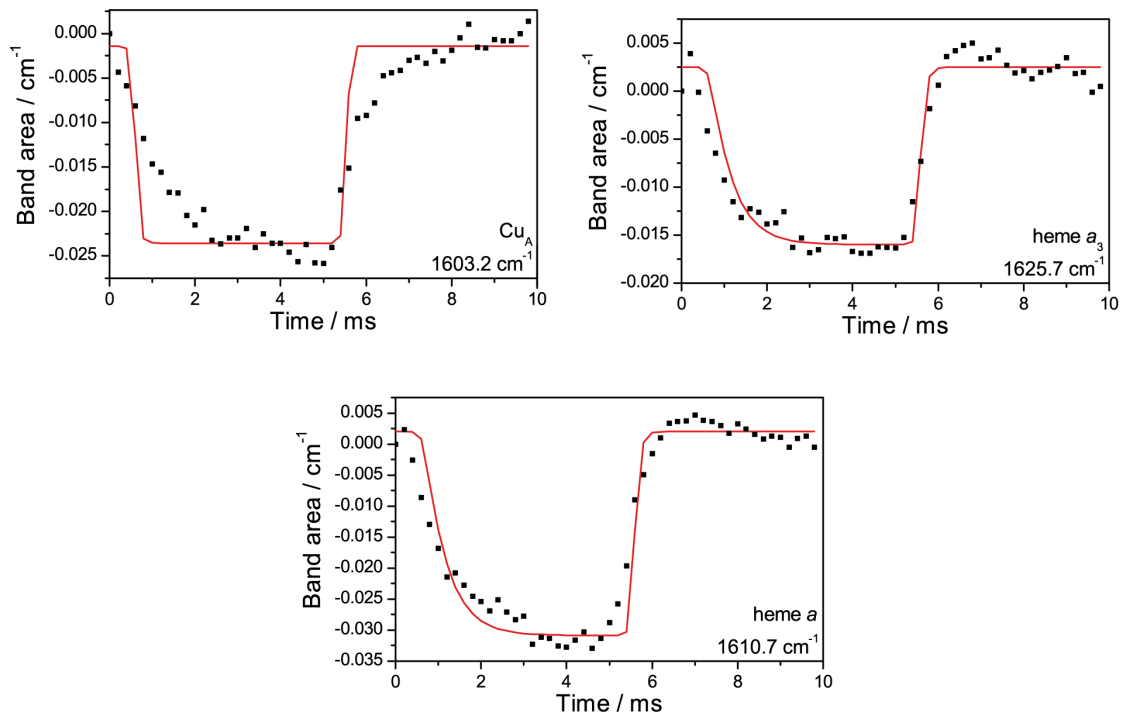


Abbildung 3.14: Bandenintensität der Redoxzentren Cu_A, Häm a und Häm a₃ aufgetragen gegen die Zeit. Die roten Linien zeigen die durch das Elektronentransfermodell gefitteten Kurven.

Das Modell konnte ausreichend an die gemessenen Daten angefitet werden. Erkennbar ist die leichte Verzögerung der Reaktion auf den Potentialwechsel bei den gefitteten Kurven (rote Linie). Grund dafür ist die Aufladezeit der Doppelschicht.

Tabelle 7: Fit-Parameter der Computerauswertung

Parameter	Wert
pK_1^r	8.092
pK_1^o	2.479
pK_2^r	9.2878
pK_2^o	5.382
pK_3^r	4.514
pK_3^o	1.838
pK_4^r	1.487
pK_4^o	0.776
E_1^0 [mV]	-192.1
E_2^0 [mV]	-202.3
E_3^0 [mV]	-127.7
E_4^0 [mV]	-443.7
k_e [s ⁻¹]	536.35
τ [ms]	0.5504

3.2.6. Conclusio von 3.2

Bei den Untersuchungen der zeitaufgelösten Spektren bei unterschiedlichen Anregungsfrequenzen wurden zwei Beobachtungen gemacht. Zum einen sinkt die Absorbanz mit steigender Anregungsfrequenz. Dies ist charakteristisch für Messungen mittels modulierter Anregung. Entsprechend der Theorie bleibt die Absorbanz bei geringen Anregungsfrequenzen konstant, sinkt jedoch einer gewissen Frequenz ab, da die angeregte Spezies nicht schnell genug reagieren kann um mit der Anregung gleichzukommen. Zum anderen verändert sich die Kurvenform wenn man die Absorbanz gegen die Zeit aufträgt. Bei geringen Frequenzen ist die Steigung der Änderungskurve sehr steil und wird mit steigender Anregungsfrequenz geringer.

Beim Vergleich von Amid I Banden von modulierten Spektren und unmodulierten Spektren zeigt sich ein Unterschied in der Zusammensetzung. In den zeitaufgelösten Spektren gehören die Banden von β -Sheets (1603, 1615, 1619, 1625 cm⁻¹) zu den

intensivsten. Im Gegensatz dazu sind in den Titrations- und Anbindungsspektren α -Helices am stärksten ausgeprägt [64]. Dies lässt sich dadurch erklären, dass β -Sheets eine größere Flexibilität als α -Helices besitzen und somit schneller auf die Anregung reagieren können.

In den bekannten tr-FTIR-Untersuchungen ist der Fingerprintbereich im Verhältnis zur Amid I Bande intensiver ausgeprägt. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass aufgrund der aufgedampften Metallschicht Dipole, die normal zur Reflexionsebene stehen, sichtbar sind, Dipole die in andere Richtungen ausgerichtet sind nicht. Da das Protein ausgerichtet ist, und die α -Helices aufgrund dessen eine Ausrichtung in z-Richtung haben werden diese besonders empfindlich angezeigt.

Die Absorbanz der einzelnen Banden ändert sich im ms-Bereich und es wurden drei Banden ausgewählt um das Modell an die Daten anzufitten. Es zeigte sich dass die Ratekonstante der elektrochemischen Anregung den limitierenden Faktor darstellt, da außerdem τ und k_e experimentell nicht voneinander getrennt werden können. Es besteht eine kleine Abweichung von den zuvor mittels Cyclovoltammetrie bestimmten Werten (τ : 0,55 ms vs. 1 ms; k_e : 536 s⁻¹ vs. 370 s⁻¹), jedoch befinden sie sich in der selben Größenordnung. Die E^0 -Werte sind im Vergleich zur Literatur [34] zu negativen Potentialen verschoben, was auf die Konformationsänderung vom resting State in den pulsed state zurückgeführt wird. Da das Protein elektrochemisch in den pulsed State umgewandelt wird, werden die Standardredoxpotentiale der höheren Oxidationszustände (P und F) der Häm e angezeigt. Die Annahme, dass unterschiedliche pK-Werte zwischen zwei Redoxpaaren (z.B.: $pK_2^r > pk_1^r$ oder $pK_3^r > pK_4^r$) zu der Protonenaufnahme und -abgabe führen, werden durch die erhaltenen Werte gestützt.

3.3. Vorschau: Aerobe EC modulierte Step Scan Messung

Zum Herstellen von aeroben Bedingungen wurde die Sauerstoffkonzentration mittels Spülen des Puffers mit Argon verringert und der O₂- und Ar-Fluss mit Hilfe von Ventilen so lange eingestellt, bis die O₂-Konzentration im Pufferkonstant war.

Die Potentiale wurden in Form einer Rechtecksfunktion zwischen -800mV vs. SHE und dem Open Circuit Potential (OCP) angelegt. Das OCP ist als jenes Potential definiert, bei dem kein Strom fließt, d.h. keine Elektronen wandern. Als Maximal eingestelltes OCP wurden +250mV vs. SHE festgelegt, da bei höherem Potential die Reduktion von Cu_A statt findet.

3.3.1. Vergleich von anaerober und aerober Messung

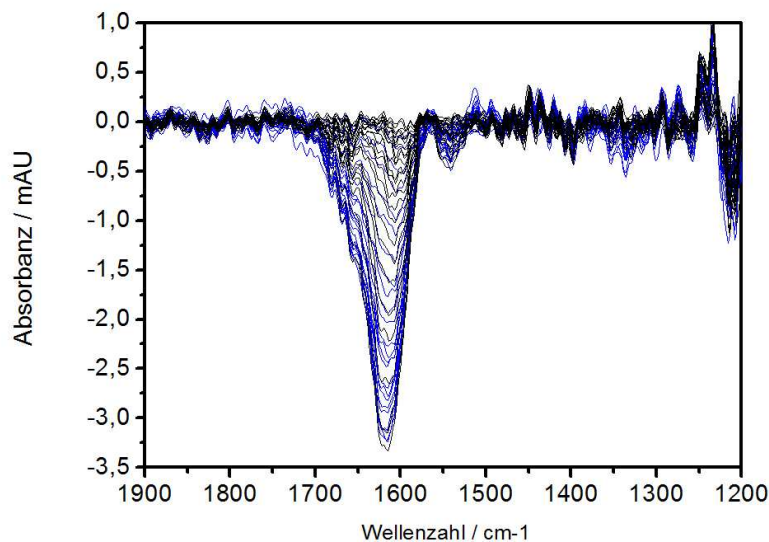


Abbildung 3.15: tr-SEIRA Spektren bei einer Anregungsfrequenz von 100 Hz unter aeroben (0,04 mg/l) Bedingungen und pH 8.

Die zeitaufgelösten Absorptionsspektren unter aeroben Bedingungen sind in Abb. 3.15 dargestellt. Die intensivste Bande ist wiederum die Amid I Bande, außerdem ist im Unterschied zu den Spektren unter anaeroben Bedingungen auch eine kleine

Amid II Bande im Bereich von $1560\text{--}1520\text{ cm}^{-1}$ zu erkennen. Weiters sind die Banden im Fingerprintbereich besser vom Rauschen getrennt als in den Abb. 3.12 gezeigten Spektren.

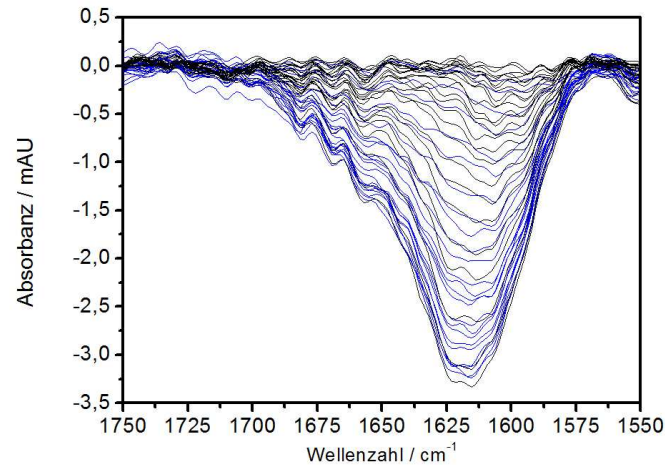


Abbildung 3.16: tr-SEIRA Spektren der Amid I Bande bei einer Anregungsfrequenz von 100 Hz unter anaeroben Bedingungen (0,04 mg/l) und pH 8.

Die Isolation der einzelnen Bandenkomponenten der Amid I Bande wurde mittels PSD unter Verwendung der von Schweighofer et al. (Tabelle 4) ermittelten Parameter durchgeführt.

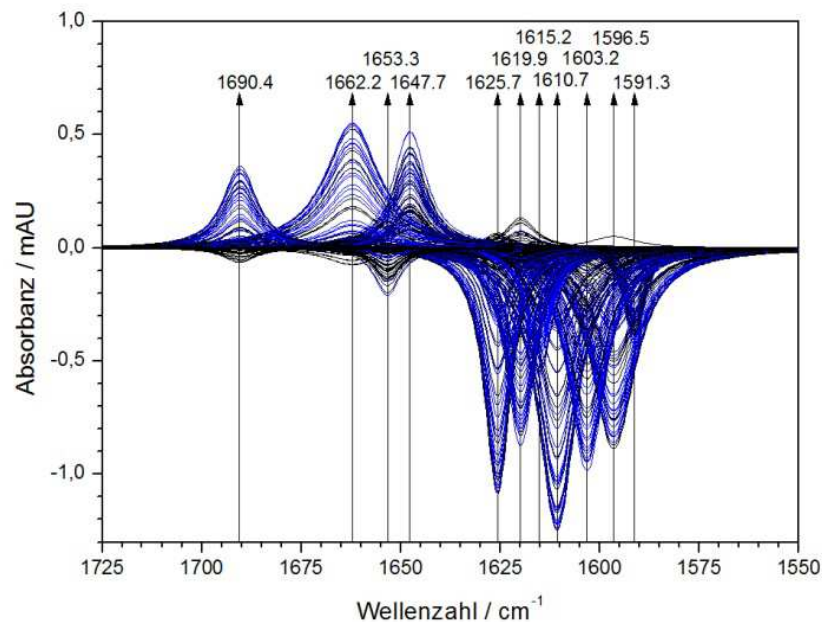


Abbildung 3.17: Aufgetrennte Banden aus den tr-SEIRA Spektren, aufgenommen bei einer Anregungsfrequenz von 100 Hz und aeroben Bedingungen (0,04 mg/l).

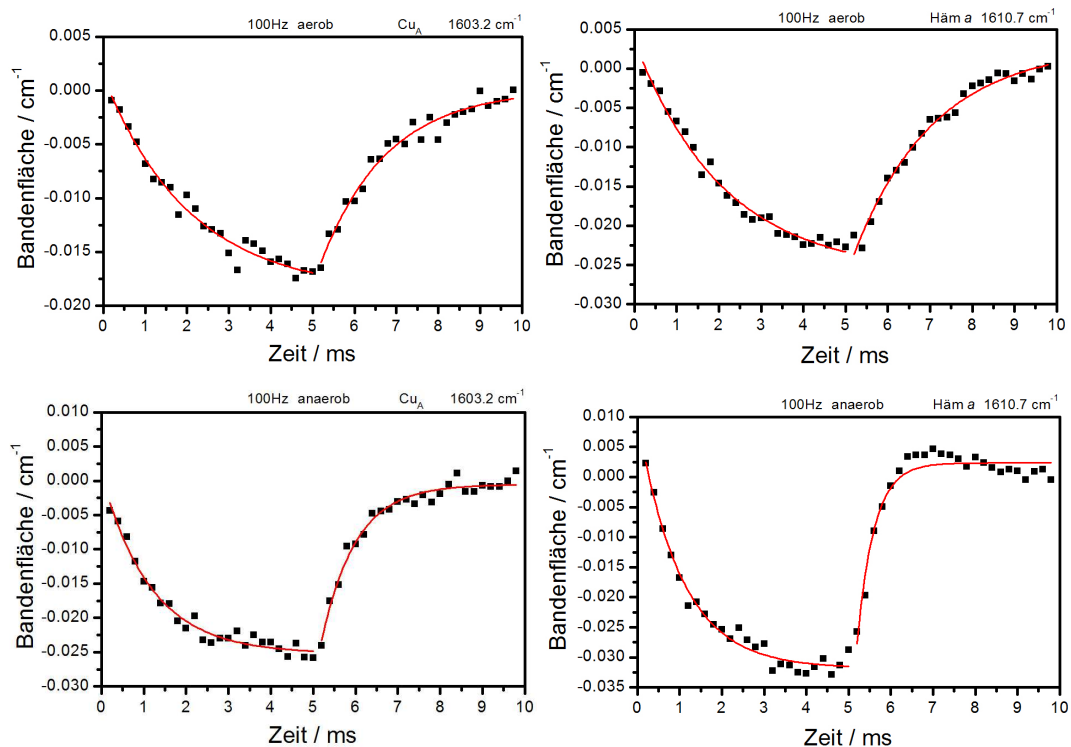


Abbildung 3.18: Vergleich der Redoxzentren Cu_A und Häm a bei 100 Hz unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Die unterschiedlichen Geschwindigkeiten bis zur Absättigung der Oxidation lassen sich gut erkennen. Bei der anaeroben Messung erfolgt die Absättigung nach ca. 5 ms, bei aeroben Bedingungen ist diese nicht abgeschlossen.

Der Vergleich von aeroben und anaeroben Spektren zeigt, dass diese sich leicht unterscheiden. Die Oxidation verläuft unter aeroben Bedingungen langsamer als unter anaeroben Bedingungen. Ebenso lässt sich bei manchen Banden eine langsamere Reaktion bei der Reduktion erkennen.

3.3.2. Einfluss der Halbperiodenlänge auf die Messung

Zur Optimierung der Messbedingungen wurde der Einfluss der Halbperiodenlänge bei einer Anregungsfrequenz von 100 Hz untersucht. Dafür wurden das Verhältnis von oxidativer und reduktiver Halbperiode 50:50, 65:35 und 80:20 gewählt. Zur Untersuchung wurde die Absorption gegen die Zeit aufgetragen.

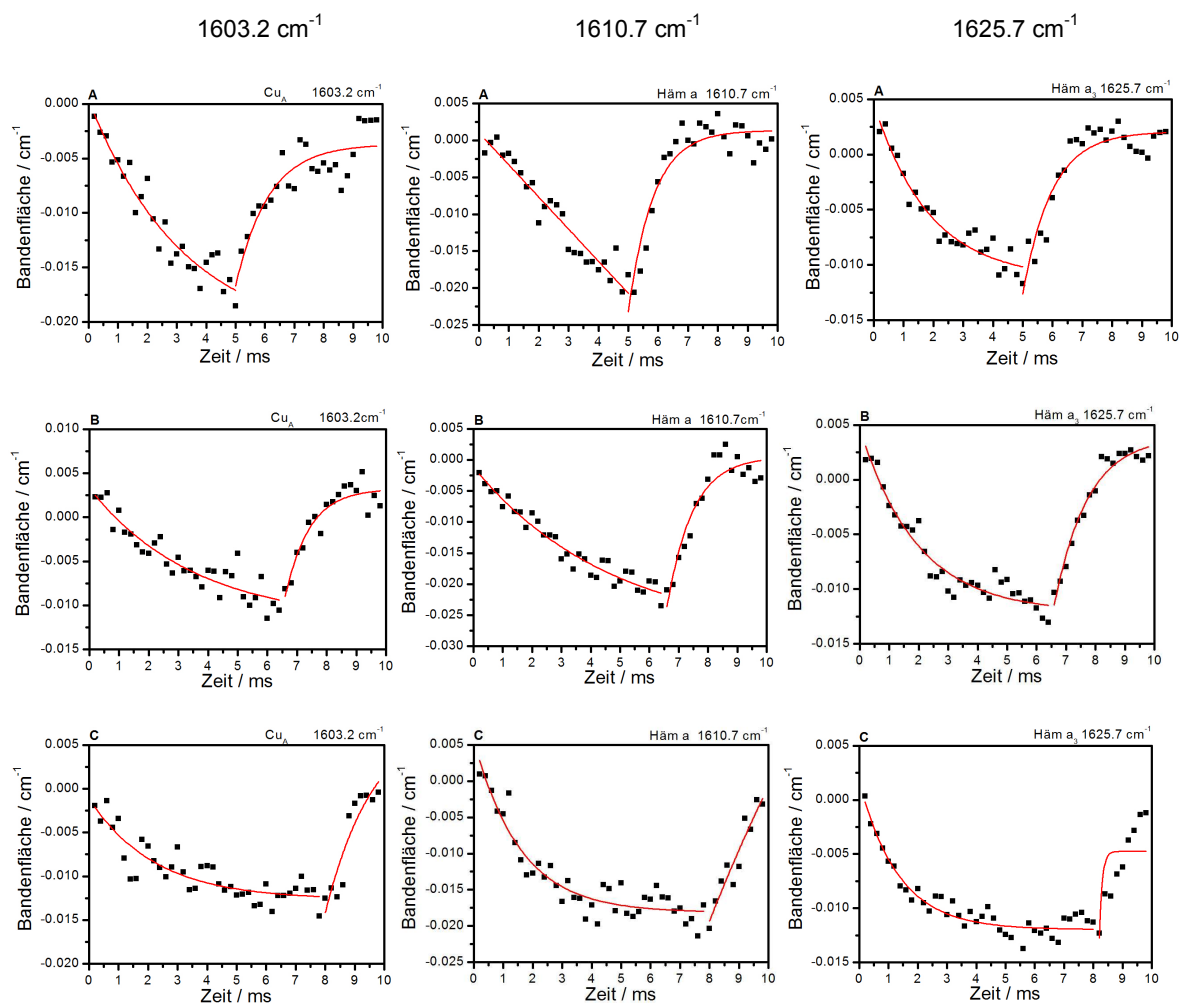


Abbildung 3.19: Intensitätsveränderung der 1603.2, 1610.7 und 1625.7 cm^{-1} Banden aufgetragen gegen die Zeit, aufgenommen bei einer Anregungsfrequenz von 100 Hz und unterschiedlichen Verhältnissen zwischen der oxidativen (erste) und reduktiven (zweite) Halbperiode: Reihe A: 50:50; Reihe B: 65:35; Reihe C: 80:20.

Im Vergleich der Absorbanzänderungen gegen die Zeit bei verschiedenen Halbperioden zeigt sich der Geschwindigkeitsunterschied von Oxidation und Reduktion. Die Oxidation ist nach 6.5 ms, die Reduktion nach 3.5 ms abgeschlossen. Es konnte beobachtet werden dass ein Ox/Red-Verhältnis von 80:20 zu einer zu kurzen Reduktionszeit führt und es somit zu keiner vollständigen Absättigung kommt. Bei einem Ox/Red-Verhältnis von 50:50 kommt es während der Oxidation zu keiner Absättigung.

3.3.3. Conclusio von 3.3

Es konnte gezeigt werden, dass sich aerobe und anaerobe Spektren unterscheiden. Vor allem die Oxidation verläuft unter aeroben Bedingungen langsamer als unter anaeroben. Dies lässt sich durch unterschiedliche Reaktionswege erklären. Bei der anaeroben Messung wird das Enzym elektrochemisch oxidiert und reduziert. Im Gegensatz dazu wird unter aeroben Bedingungen das Enzym nur elektrochemisch reduziert, die Oxidation erfolgt durch die enzymatische Reduktion von O_2 . Aufgrund der unterschiedlichen Reaktionen kann es zu nicht nur zu unterschiedlichen Geschwindigkeiten sondern auch zu Konformationsänderungen kommen, die mit dem eigentlichen Pumpvorgang zusammenhängen. Das betrifft auch besonders Aminosäuren, die bei dem katalytischen Umsatz ihre Struktur ändern Dabei ist der Fingerprint deutlicher ausgeprägt als bei der anaeroben Messung.

4. Conclusio

In dieser Masterarbeit wurden mit Hilfe von tr-SEIRAS die Konformationsänderungen des Proteins während der elektrochemischen Oxidation und Reduktion beobachtet. Dabei wurden die Ergebnisse der Arbeit von Schwaighofer bestätigt, bei verbessertem SNR. Daher konnten die einzelnen, mittels PSD-Analyse gefundenen Bandenparameter der Amid I Banden-Komponenten übernommen werden. Das bessere Ergebnis lässt sich durch den Einsatz einer anderen CcO-Charge erklären, die sich durch eine höhere Aktivität auszeichnet.

Die zeitaufgelösten Spektren zeichnen sich im Gegensatz zur Literatur durch mehrere Charakteristika aus. Zum einen ist die Amid I Region im Verhältnis zur Fingerprintregion um vieles größer als in bisher publizierten Messungen. Das wird auf die in senkrechte Ausrichtung der helikalen Strukturen innerhalb des Proteins zurückgeführt. Das entspricht der Theorie der SEIRAS, nach der die Signale von Dipolen, welche senkrecht zur Metalloberfläche stehen, besonders verstärkt werden. Trotzdem kann man feststellen, dass es während des Elektronentransfers zu größeren Konformationsänderungen kommt, als es aufgrund der bisher publizierten Daten angenommen wurde. Das ergibt sich auch aus dem Vergleich von modulierten und unmodulierten Spektren. Dieses Argument wird durch die stärkere Intensität der Banden der β -Sheets im Verhältnis zu denen der α -Helices unterstützt. Das verstärkte Auftreten der β -Sheetsbanden wird auf die größere Flexibilität der β -Sheets zurückgeführt. Diese Beobachtung wird durch MD (molecular dynamics) Berechnungen der Röntgenstruktur des Enzyms bestätigt [65]. Bei der Analyse der in der Amid I Region gefundenen Banden zeigt sich eine systematische Abhängigkeit der kinetischen Messungen von der Anregungsfrequenz. Dieses Verhalten geht mit der Theorie der modulierten Anregung einher, welche außerdem ein Absinken der maximalen Absorbanz mit steigender Anregungsfrequenz vorhersagt.

Das erweiterte kinetische Modell konnte an die Daten angefitet werden, obwohl Daten von nur drei der vier Redoxzentren genutzt werden konnten. Die erhaltenen Parameter entsprechen den Fit-Ergebnissen aus der Cyclovoltammetrie. So sind die Standardredoxpotentiale im Vergleich zur Literatur in den negativen Bereich verschoben. Dies wird auf die Veränderung der Konformation in den pulsed State

und die Umwandlung in die höheren Redoxzustände der Häm zurückgeführt. Ebenso ermöglichen die erhaltenen pK-Werte einen Protonenaustausch. Jedoch ist das zeitliche Verhalten der Spektren wesentlich von der Aufladungszeit und der elektrochemischen Geschwindigkeitskonstante bestimmt welche experimentell nicht voneinander getrennt werden können. Die Ergebnisse der Messungen unter anaeroben Bedingungen sind in der Arbeit Schwaighofer et al [63] (2013; eingereicht in Biophysical Journal) zusammengefasst.

Die zeitaufgelösten Spektren unter aeroben Bedingungen lieferten ein ähnliches Bild wie die unter anaeroben Bedingungen. Jedoch zeigte sich eine Verringerung der Geschwindigkeit, im oxidativen Teil der Messung. Diese Veränderung deckt sich mit den Erwartungen, da das Enzym unter anaeroben Bedingungen elektrochemisch und unter aeroben Bedingungen durch O₂ katalytisch oxidiert wird.

5. Anhang

5.1. Chemikalien und Lösungen

1,2 Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DiPhyPC) - Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, USA)

3,3'-Dithiopropionat (DTP) - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

3-Mercaptopropyltrimethoxysilane (MTES) – ABCR GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Argon - Linde Gas (Wien, Österreich)

Silizium ATR-Kristalle – Korth Kristalle GmbH (Deutschland)

Cytochrom *c* Oxidase aus *Rhodobacter sphaeroides* mit His-Tag an Untereinheit II – Gruppe von S. Ferguson-Miller (University of Michigan, USA)

Diamantpoliter MetaDi Supreme 9µm, 3µm, 1µm – Buehler (Deutschland)

n-Dodecyl-β-Maltosid (DDM) - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Dimethylsulfoxid (DMSO) - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Ethanol absolut – VWR (Darmstadt, Deutschland)

Glucose Oxidase von *Aspergillus Niger* - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Glucose (D-Glucose) -Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Gold – Mateck GmbH (Juelich, Deutschland)

Goldchlorid (99,99%) - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Kaliumchlorid (KCl) - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Dikaliumhydrogenphosphat– Fluka (St. Louis, USA)

Nickel-(II)-Chlorid (98%) - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Hydroxylamin Hydrochlorid (NH₂OH.HCl, 99%) - Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Sauerstoff - Linde Gas (Wien, Österreich)

Stickstoff (gas) - Linde Gas (Wien, Österreich)

Stickstoff (flüssig) - TU Wien (Wien, Österreich)

5.2. Messinstrumente

Analysewaage:	ABT120-5DM (Kern)
Autoklav:	UniEquip
Bedampfungsanlage:	FL400 (HHV)
Funktionsgenerator	33250A (Aligent)
IR-Spektrometer:	Vertex 70v (Bruker Optics)
pH-Meter:	Seven Multi (Mettler Toledo)
Potentiostat:	PGSTAT12 (Autolab)
Ultraschallbad	S180H (Elmasonic)

5.3. Curriculum Vitae

Christoph Steininger

Adresse: Kirchengasse 5/1/7, 1070 Wien, Österreich

Email: christophsteininger@gmx.at

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 20.07.1988, St. Pölten

Nationalität: Österreich

Akademische Ausbildung:

Juni 2012 – Feb. 2013: Durchführung der Masterarbeit am Austrian Institute of Technology, Wien, Österreich; Departement Biosensor Technologies; Betreut durch Dr. Christoph Nowak und Dr. Renate Naumann

Okt. 2010 – August 2013: Studium "Biologische Chemie" an der Universität Wien

Jän. 2010 – Juni 2010: Durchführung der Bachelorarbeit am Allgemeinen Krankenhaus der Stadt Wien; Abteilung für Infektiologie und Tropenmedizin, Betreut durch Dr. Christoph Steininger und Dr. Katrina Vanura

Sept. 2007 – Juni 2010: Studium "Molekulare Biotechnologie" an der Fachhochschule Campus Wien

Publikationen:

Schwaighofer A., **Steininger C.**, Hildenbrandt D., Srajer J., Ferguson-Miller S., Nowak C., Knoll W., Naumann R.; *Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron Transfer to Cytochrome c Oxidase from R. sphaeroides*; submitted to Biophysical Journal

Katrina Vanura, Franz Rieder, Marie-Theres Kastner, Julia Biebl, Michael Sandhofer, Trang Le, Robert Strassl, Elisabeth Puchhammer-Stöckl, Thomas Perkmann, **Christoph F Steininger**, Kostas Stamatopoulos, Wolfgang Graninger, Ulrich Jäger, Christoph Steininger; *Chronic lymphocytic leukemia patients have a preserved cytomegalovirus-specific antibodyresponse despite progressive hypogammaglobulinemia*; submitted to PLOS ONE

6. Literaturverzeichnis

1. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry*. 6th ed. 2007, New York: W.H. Freeman.
2. Purves, W.K., *Life, the science of biology*. 7th ed. 2004, Sunderland, Mass. Gordonsville, VA: Sinauer Associates ; W.H. Freeman and Co.
3. Sagan, L., *On the origin of mitosing cells*. Journal of theoretical biology, 1967. **14**(3): p. 255-74.
4. Mitchell, P., *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism*. Nature, 1961. **191**: p. 144-8.
5. Shapleigh, J.P., et al., *Spectroscopic and genetic evidence for two heme-Cu-containing oxidases in Rhodobacter sphaeroides*. Journal of bacteriology, 1992. **174**(7): p. 2338-43.
6. Shapleigh, J.P. and R.B. Gennis, *Cloning, sequencing and deletion from the chromosome of the gene encoding subunit I of the aa3-type cytochrome c oxidase of Rhodobacter sphaeroides*. Molecular microbiology, 1992. **6**(5): p. 635-42.
7. Cao, J.L., et al., *The Gene Encoding Cytochrome-C-Oxidase Subunit-Ii from Rhodobacter-Sphaeroides - Comparison of the Deduced Amino-Acid-Sequence with Sequences of Corresponding Peptides from Other Species*. Gene, 1991. **101**(1): p. 133-137.
8. Bratton, M.R., M.A. Pressler, and J.P. Hosler, *Suicide inactivation of cytochrome c oxidase: catalytic turnover in the absence of subunit III alters the active site*. Biochemistry, 1999. **38**(49): p. 16236-45.
9. Svensson-Ek, M., et al., *The X-ray crystal structures of wild-type and EQ(I-286) mutant cytochrome c oxidases from Rhodobacter sphaeroides*. Journal of Molecular Biology, 2002. **321**(2): p. 329-339.
10. Kadenbach, B., et al., *Separation of Mammalian Cytochrome-C-Oxidase into 13 Polypeptides by a Sodium Dodecyl-Sulfate Gel-Electrophoretic Procedure*. Analytical Biochemistry, 1983. **129**(2): p. 517-521.
11. Hosler, J.P., et al., *Cytochrome-Aa3 of Rhodobacter-Sphaeroides as a Model for Mitochondrial Cytochrome-C-Oxidase - Purification, Kinetics, Proton Pumping, and Spectral-Analysis*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(34): p. 24264-24272.
12. Capaldi, R.A., *Structure and function of cytochrome c oxidase*. Annual review of biochemistry, 1990. **59**: p. 569-96.

13. Zhen, Y., et al., *Overexpression and purification of cytochrome c oxidase from Rhodobacter sphaeroides*. Protein Expression and Purification, 1998. **13**(3): p. 326-336.
14. Ataka, K., B. Richter, and J. Heberle, *Orientational control of the physiological reaction of cytochrome c oxidase tethered to a gold electrode*. Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(18): p. 9339-9347.
15. Ataka, K., et al., *Oriented attachment and membrane reconstitution of his-tagged cytochrome c oxidase to a gold electrode: In situ monitoring by surface-enhanced infrared absorption spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(49): p. 16199-16206.
16. Kirste, V.U., *Elektrochemisch gesteuerte zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie an Redox-Membranproteinen in einer biomimetischen Membran-Architektur*, 2007, Johannes-Gutenberg-Universität: Mainz.
17. Antonini, E., et al., *Oxygen Pulsed Cytochrome-C Oxidase - Functional Properties and Catalytic Relevance*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977. **74**(8): p. 3128-3132.
18. Iwata, S., et al., *Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans*. Nature, 1995. **376**(6542): p. 660-9.
19. Branden, M., et al., *On the role of the K-proton transfer pathway in cytochrome c oxidase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(9): p. 5013-5018.
20. Qin, L., et al., *Redox-dependent conformational changes in cytochrome C oxidase suggest a gating mechanism for proton uptake*. Biochemistry, 2009. **48**(23): p. 5121-30.
21. Adelroth, P., R.B. Gennis, and P. Brzezinski, *Role of the pathway through K(I-362) in proton transfer in cytochrome c oxidase from R-sphaeroides*. Biochemistry, 1998. **37**(8): p. 2470-2476.
22. Fetter, J.R., et al., *Possible proton relay pathways in cytochrome c oxidase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(5): p. 1604-8.
23. Tomson, F.L., et al., *Substitutions for glutamate 101 in subunit II of cytochrome c oxidase from Rhodobacter sphaeroides result in blocking the proton-conducting K-channel*. Biochemistry, 2003. **42**(6): p. 1711-7.
24. Hofacker, I. and K. Schulten, *Oxygen and proton pathways in cytochrome c oxidase*. Proteins-Structure Function and Genetics, 1998. **30**(1): p. 100-107.
25. Schmidt, B., J. McCracken, and S. Ferguson-Miller, *A discrete water exit pathway in the membrane protein cytochrome c oxidase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(26): p. 15539-42.

26. Seibold, S.A., et al., *Water chain formation and possible proton pumping routes in Rhodobacter sphaeroides cytochrome c oxidase: a molecular dynamics comparison of the wild type and R481K mutant*. Biochemistry, 2005. **44**(31): p. 10475-85.
27. Wikstrom, M., *Active site intermediates in the reduction of O₂ by cytochrome oxidase, and their derivatives*. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics, 2012. **1817**(4): p. 468-475.
28. Giess, F., et al., *The protein-tethered lipid bilayer: a novel mimic of the biological membrane*. Biophysical journal, 2004. **87**(5): p. 3213-20.
29. Nowak, C., et al., *Oriented immobilization and electron transfer to the cytochrome c oxidase*. Journal of Solid State Electrochemistry, 2011. **15**(1): p. 105-114.
30. Friedrich, M.G., et al., *Activity of membrane proteins immobilized on surfaces as a function of packing density*. Journal of Physical Chemistry B, 2008. **112**(10): p. 3193-3201.
31. Srajer, J., et al., *A kinetic model of proton transport in a multiredox centre protein: cytochrome c oxidase*. Progress in Reaction Kinetics and Mechanism, 2013. **38**(1): p. 32 – 47.
32. Friedrich, M.G., et al., *Active site structure and redox processes of cytochrome c oxidase immobilised in a novel biomimetic lipid membrane on an electrode*. Chem Commun (Camb), 2004(21): p. 2376-7.
33. Schach, D., et al., *Modeling direct electron transfer to a multi-redox center protein: Cytochrome c oxidase*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2010. **649**: p. 268-276.
34. Gorbikova, E.A., et al., *Time-resolved ATR-FTIR spectroscopy of the oxygen reaction in the D124N mutant of cytochrome C oxidase from Paracoccus denitrificans*. Biochemistry, 2007. **46**(45): p. 13141-13148.
35. Gorbikova, E.A., et al., *Redox titration of all electron carriers of cytochrome c oxidase by Fourier transform infrared spectroscopy*. Biochemistry, 2006. **45**(17): p. 5641-9.
36. Stuart, B., *Infrared spectroscopy : fundamentals and applications*. Analytical techniques in the sciences. 2004, Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ: J. Wiley. xv, 224 p.
37. Hesse, M., H. Meier, and B. Zeeh, *Spectroscopic methods in organic chemistry*. Thieme foundations of organic chemistry series. 2008, Thieme, New York: Thieme Verlag. ix, 453 p.
38. Arrondo, J.L., et al., *Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy*. Progress in biophysics and molecular biology, 1993. **59**(1): p. 23-56.

39. Cioni, P. and Strambini, G. B., *Effect of Heavy Water on Protein Flexibility*. Biophysical Journal, 2002. **82**: p. 3246.
40. Meier, R., *On art and science in curve-fitting vibrational spectra*. Vibrational Spectroscopy, 2005. **39**: p. 266-269.
41. Goos, F. and H. H., *Ein neuer und fundamentaler Versuch zur Totalreflexion*. Annalen der Physik, 1947. **436**(7-8): p. 333-346.
42. Goos, F. and H. Hänchen, *Neumessung des Strahlversetzungseffektes bei Totalreflexion*. Annalen der Physik, 1949. **44**(3-5): p. 251-252.
43. Harrick, N.J., *Electric Field Strengths at Totally Reflecting Interfaces*. Journal of the Optical Society of America, 1965. **55**(7): p. 851-856.
44. Harrick, N.J., *Internal reflection spectroscopy*. 1967, New York,: Interscience Publishers. xiv, 327 p.
45. Chalmers, J.M. and P.R. Griffiths, *Handbook of vibrational spectroscopy*. 2002, New York: J. Wiley.
46. Ekgasit, S., H.W. Siesler, and P.A.M. Steeman, *Dynamic infrared spectroscopy using the rapid-scan technique*. Applied Spectroscopy, 1999. **53**(12): p. 1535-1541.
47. Hartstein, A., J.R. Kirtley, and J.C. Tsang, *Enhancement of the Infrared-Absorption from Molecular Monolayers with Thin Metal Overlayers*. Physical Review Letters, 1980. **45**(3): p. 201-204.
48. Osawa, M. and K. Ataka, *Electromagnetic mechanism of enhanced infrared absorption of molecules adsorbed on metal island films*. Surface Science Letters, 1992. **262**: p. L118-L122.
49. Nowak, C., et al., *A Two-Layer Gold Surface with Improved Surface Enhancement for Spectro-Electrochemistry Using Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy*. Applied Spectroscopy, 2009. **63**(9): p. 1068-1074.
50. Baurecht, D., I. Porth, and U.P. Fringeli, *A new method of phase sensitive detection in modulation spectroscopy applied to temperature induced folding and unfolding of RNase A*. Vibrational Spectroscopy, 2002. **30**(1): p. 85-92.
51. Gremlich, H.-U. and B. Yan, *Infrared and raman spectroscopy of biological materials*. Practical spectroscopy. 2001, New York: M. Dekker. ix, 581 p.
52. Schach, D., *Direct electron transfer of Cytochrome c Oxidase investigated by Electrochemistry and time resolved surface-enhanced Infrared Absorption Spectroscopy*, 2011, Johannes Gutenberg Universität: Mainz.
53. Friedrich, M.G., et al., *In situ monitoring of the catalytic activity of cytochrome c oxidase in a biomimetic architecture*. Biophysical Journal, 2008. **95**(3): p. 1500-1510.

54. Naumann, R.L.C. and W. Knoll, *Protein tethered lipid bilayer: An alternative mimic of the biological membrane (Mini Review)*. Biointerphases, 2008. **3**(2): p. Fa101-Fa107.
55. Qin, L., et al., *Conserved lipid-binding sites in membrane proteins: a focus on cytochrome c oxidase*. Current opinion in structural biology, 2007. **17**(4): p. 444-50.
56. Qin, L., et al., *A conserved steroid binding site in cytochrome C oxidase*. Biochemistry, 2008. **47**(38): p. 9931-3.
57. Hiser, C., et al., *A conserved amphipathic ligand binding region influences k-path-dependent activity of cytochrome C oxidase*. Biochemistry, 2013. **52**(8): p. 1385-96.
58. Schwaighofer, A., et al., *Proteindynamics of Cytochrome c Oxidase: Analysis of vibrational components by Phase Sensitive Detection applied to Modulated Excitation-SEIRAS*. Royal Society of Chemistry, 2013: p. in Preparation.
59. Hellwig, P., et al., *Electrochemical and ultraviolet/visible/infrared spectroscopic analysis of heme a and a₃ redox reactions in the cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans: separation of heme a and a₃ contributions and assignment of vibrational modes*. Biochemistry, 1999. **38**(6): p. 1685-94.
60. Goormaghtigh, E., V. Cabinaux, and J.-M. Ruyschaert, *Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films*. Eur. J. Biochem, 1990. **193**: p. 409-420.
61. Iwaki, M., et al., *Structural and chemical changes of the P(M) intermediate of paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase revealed by IR spectroscopy with labeled tyrosines and histidine*. Biochemistry, 2006. **45**(36): p. 10873-85.
62. Friedrich, M.G., et al., *Electronic wiring of a multi-redox site membrane protein in a biomimetic surface architecture*. Biophysical Journal, 2008. **94**(9): p. 3698-3705.
63. Schwaighofer, A., et al., *Time-Resolved Surface-Enhanced IR-Absorption Spectroscopy of direct Electron Transfer to Cytochrome c Oxidase form R. sphaeroides*. 2013. **in preparation**.
64. Nowak, C., et al., *Conformational transitions and molecular hysteresis of cytochrome c oxidase: Varying the redox state by electronic wiring*. Soft Matter, 2010. **6**(21): p. 5523-5532.
65. Buhrow, L., S. Ferguson-Miller, and L.A. Kuhn, *From static structure to living protein: computational analysis of cytochrome c oxidase main-chain flexibility*. Biophysical journal, 2012. **102**(9): p. 2158-66.

7. Abstract

Abstract - Deutsch

Der respiratorische Enzymkomplex Cytochrom *c* Oxidase des Bakteriums *Rhodobacter sphaeroides* wurde mittels FTIR-Spektroskopie untersucht. Dazu wurde dieser auf einer Two-Layer Gold Surface immobilisiert, welche sich auf einem Siliziumkristall befindet. Zur Erzeugung nativer Bedingungen wurde eine biomimetische Membran um das Enzym gebildet. Mittels zeitaufgelöster oberflächenverstärkter Absorptions-Infrarotspektroskopie wurde die Veränderung der Sekundärstruktur unter anaeroben Bedingungen während elektrochemisch modulierter Anregung beobachtet. Die Amid I Bande wurde mittels, aus phasensensitiver Detektion erhaltenen Parametern, in einzelne, verschiedenen Redoxzentren zugeordneten Komponenten aufgetrennt. In den Absorptionsspektren konnten große Änderungen der Sekundärstruktur aufgrund der Veränderung der Redoxzustände beobachtet werden. Zur Auswertung der Messungen wurde das erweiterte Modell des Elektronentransfers an die Daten von drei Redoxzentren angefügt. Die Ergebnisse konnten trotz Abweichungen gut mit den bereits aus Messungen mittels Cyclovoltammetrie erhaltenen Daten verglichen werden. Versuche unter aeroben Bedingungen zeigten, dass sich diese Spektren von den Messungen unter anaeroben Bedingungen unterscheiden.

Abstract – English

The respiratory enzyme complex Cytochrome *c* Oxidase from the bacteria *Rhodobacter sphaeroides* was investigated using FTIR-spectroscopy. For this purpose, CcO was immobilised on a two-layer gold surface, which had been attached on a silicone ATR-crystal. In order to mimick physiological conditions, a bilayer lipid membrane was spanned around the enzyme complexes. Changes of the secondary structure were observed using time-resolved surface enhanced absorption infrared spectroscopy during electrochemical modulation under anaerobic conditions. The amide I band has been deconvoluted into single bands, using parameters obtained from phase-sensitive detection. These bands were then assigned to different functional groups, which could be attributed to different redox centers. We were thus able to observe conformation changes of the secondary structure as a function of changes of the redoxstates. For analysis purposes, the extended sequential four electron transfer model was fitted to the data. The results are consistent with previous findings from cyclic voltammetry. Experiments under aerobic conditions show significant differences to the measurements obtained under anaerobic conditions..