

Protein-modifizierte Elektroden: Immobilisierung und Elektronentransfer

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

von

Peter Schön

aus Flieden

Universität Osnabrück

Fachbereich Biologie / Chemie

Institut für Chemie

Osnabrück 2003

Die experimentellen Arbeiten wurden von Mai 1999 bis März 2003 im Institut für Chemie der Universität Osnabrück unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Lorenz Walder durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. L. Walder, Universität Osnabrück

Korreferent: Prof. Dr. M. D. Lechner, Universität Osnabrück

Datum der Abgabe: 28.07.2003

Datum der Prüfung: 05.09.2003

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem geschätzten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Lorenz Walder, für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit und die zahlreichen lehrreichen und begeisternden Diskussionen danken.

Herrn Prof. Dr. M. D. Lechner danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Meinen Eltern und meiner Familie gilt mein grosser Dank für die langjährige Unterstützung, ohne die mein Studium und diese Arbeit niemals möglich gewesen wären.

Von Herzen danke ich Katrin für ihre grosse Geduld und das Interesse an meiner Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. L. Walder gilt mein herzlicher Dank für die stets vorhandene Diskussionsbereitschaft, die Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima. Für die fortwährende Unterstützung der experimentellen Arbeiten möchte ich mich besonders Bedanken bei Frau Simona Webersinn, Frau Christine Schulz-Kölbel und Frau Marianne Gather.

Herrn Christoph Hess danke ich für die Aufnahme der Massenspektren.

Herrn Martin Görlich danke ich für die AFM-Aufnahmen.

Andreas Janshoff, Claudia Steinem (ehemals Institut für Biochemie der Universität Münster) und Joachim Wegner danke ich herzlich für die freundliche Unterstützung bei der Einrichtung der Messzellen.

Den Mitarbeitern der Feinmechanischen Werkstatt des Fachbereichs Physik der Universität Osnabrück, insbesondere Herrn Holger Heine und Herrn Johannes Dreyer, gilt mein herzlicher Dank für mechanische Konstruktionen.

Den Mitarbeitern der Elektronik-Werkstatt des Fachbereichs Physik der Universität Osnabrück, insbesondere Herrn Werner Schniederbehrend und Herrn Dirk Rathmann, gilt mein herzlicher Dank für zahlreiche elektronische Konstruktionen, insbesondere für die Programmierung der Steuer- und Kontroll-Software.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Junge (Biophysik) der Universität Osnabrück danke ich herzlich für die stete Diskussionsbereitschaft und die zur Verfügung gestellte EF₁-ATPase.

Herrn Winfried Gerbracht gilt mein besonderer Dank für die tatkräftige Unterstützung und für zahlreiche eigenständig durchgeführte Synthesen.

Für die Korrektur der Arbeit und Anregungen danke ich herzlich Helmut Rosemeyer, Dieter Steinmeier, Katrin Sonderkamp und Christine Schulz-Kölbel.

Frau Daniela Holtgräwe und Frau Anke Scholz danke ich herzlich für verschiedene Proteine und die Einweisung in Protein-Datenbanken.

Besonderer Dank gebührt dem SFB 431 "Membranproteine: Funktionelle Dynamik und Kopplung an Reaktionsketten" für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und die Einblicke in das Gebiet der Membranproteine.

Allen namentlich nicht genannten Mitarbeitern des Instituts für Chemie der Universität Osnabrück und des SFB 431 sei an dieser Stelle gedankt für die gewährte Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Inhaltsverzeichnis

1 Allgemeine Einleitung	1
1.1 Zielsetzung	3
2 Reversible spezifische Immobilisierung von His-TAG-Proteinen	4
2.1 Einleitung	4
2.1.1 Metallchelate-Affinitätschromatographie	4
2.1.2 His-TAG und Ni ²⁺ -NTA	5
2.1.3 Immobilisierung von His-TAG-Proteinen an Grenzflächen	8
2.1.4 EF ₁ -ATPase als Modellprotein für Bindungsstudien	9
2.2 Modifikation von ITO-Substraten zur Immobilisierung von Proteinen	10
2.2.1 Qualitätskontrolle von Metallchelate-modifizierten ITO-Substraten mittels einem Redoxindikator	11
2.2.1.1 Synthese von Ferrocenmonocarbonsäurehistamid	11
2.2.1.2 Elektrochemische Untersuchung von Ferrocenmonocarbonsäurehistamid	12
2.2.2 Neuartige redoxaktive Verbindungen zur Modifikation von Goldoberflächen	14
2.2.2.1 Mercaptoalkyl-derivivierte Bipyridinderivate	14
2.2.2.2 Neuartige Rotaxan-elemente zur Modifikation von Goldelektroden	16
2.3 Modifikation von QCM-Goldelektroden zur Immobilisierung von Proteinen	20
2.3.1 Synthese der Matrix-Thiole	22
2.3.1.1 Synthese des NTA-Chelators	24
2.4 Impedanzspektroskopische Qualitätskontrolle der Oberflächenmodifikation	25
2.5 Reversible spezifische Immobilisierung von His-TAG-EF₁-ATPase	29
2.5.1 Unterdrückung der unspezifischen Adsorption	29
2.5.2 Adsorption / Desorption-Zyklus	31
2.5.3 Deaktivierung und Regeneration der spezifischen Bindung	35
2.5.4 Verdünnte Protein-Oberflächen	38

3 Elektronentransfer an Protein-modifizierten Elektroden	41
3.1 Einleitung	41
3.1.1 Thyroglobulin als Modellprotein für elektrochemische Studien	43
3.2 Unspezifische Adsorption von Thyroglobulin auf Gold	44
3.2.1 AFM-Aufnahme einer Thyroglobulin-modifizierten Goldoberfläche	50
3.3 Elektronenschleusenfunktion Protein-modifizierter Goldelektroden	52
3.3.1 Redoxindikation der pH-Titration von Proteinschichten	52
3.3.2 Vergleichende Untersuchung verschiedener Proteine	57
3.3.3 pH-Schaltung des Elektronentransfers an Proteinschichten	60
3.4 Elektrostatische Akkumulation der Redoxspezies an der Proteinschicht	62
3.4.1 Akkumulation von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	62
3.4.2 Akkumulation von $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$	68
3.4.2.1 Vergleich der Strom-pH-Abhängigkeiten bei μM und 1mM Konzentrationen	72
3.4.3 Akkumulation von Viologen 1 unter Verdrängung von $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$	73
3.4.4 Abhängigkeit des Elektronentransfers von der Ladung der Redoxspezies	75
3.4.4.1 Redoxspezies mit pH-abhängiger Ladung	76
3.5 Modell des Elektronentransfers durch eine Proteinschicht	79
3.6 Suppression des Elektronentransfers	83
3.7 Induktion des Elektronentransfers	85
3.7.1 Induktion durch elektroinaktive Spezies	85
3.7.1.1 Ca^{2+} induziert $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Ströme	85
3.7.1.2 Citrat induziert $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ -Ströme	87
3.7.2 Induktion durch elektroaktive Spezies	90
3.7.2.1 Viologen 1 induziert $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Ströme	90
3.7.2.2 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ induziert Viologen 1-Ströme	92
3.7.3 Gegenseitige Induktion der Viologen 1- und $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Ströme	94
3.7.4 Suppression des induzierten Elektronentransfers	96
3.8 Katalytischer Elektronentransfer durch eine Proteinschicht	98

3.9 Kovalente Immobilisierung eines Proteins	106
3.10 Persistente Bindung eines Viologen-Dendrimers an eine Proteinschicht	111
4 Zusammenfassung	116
5 Experimenteller Teil	118
5.1 Spezielle Messtechniken	118
5.1.1 (Elektrochemische) Quarzmikrowaage ((E)QCM)	118
5.1.1.1 Elektronische Oszillatoren und Frequenzzähler	118
5.1.1.2 Schwingquarze	118
5.1.1.3 Kleinst-Volumen-Messzelle	119
5.1.1.4 Simultane Frequenz- und Resonanzwiderstandsmessung	121
5.1.1.4.1 Signalrauschen und Drift	122
5.1.1.5 Elektrochemische Quarzmikrowaage (EQCM)	123
5.1.1.6 Bestimmung der integralen Schichtwägemempfindlichkeit	124
5.1.1.7 AFM-Aufnahme und Rauigkeitsanalyse einer QCM-Goldoberfläche	126
5.1.2 Elektrochemie	127
5.1.3 Impedanzspektroskopie	127
5.2 Reinigung und Modifikation von Goldelektroden	128
5.3 Chemikalien und Proteine	129
5.4 Analytische Messtechniken zur Charakterisierung von Verbindungen	130
5.5 Synthesen	131
5.5.1 Techniken	131
5.5.2 Synthese der Matrix-Thiole	132
N_{α} , N_{α} -Bis[Carboxymethyl]- N_{ϵ} -[benzyloxycarbonyl]-L-lysin	132
N_{α} -{11-[(Methylcarbonylthio)undecyl-1]triethylenglykolcarbonyl}- N_{α} , N_{α} -methylcarboxyl-L-lysine	133
N_{α} -(11-Mercaptoundecyl-1)triethylenglykolcarbonyl- N_{α} , N_{α} -methylcarboxyl-L-lysine	134

5.5.3	Synthese von Ferrocenmonocarbonsäurehistamid	136
5.5.4	Synthese Mercaptoalkyl-modifizierter Viologenderivate	137
	Thioessigsäure-S-(5-bromo-pentyl)ester	137
	N-Thioacetyl-pentyl-4,4'-bipyridinium-bromid	138
	N-1-(5-Mercaptopentyl)-4,4'-bipyridiniumbromid	139
	Thioessigsäure-S-(3-chloro-propyl)ester	140
	Thioessigsäure-S-(3-iodo-propyl)ester	141
	N-Methyl-N'-1-(3-S-thioacetyl-propyl)-4,4'-bipyridinium-dijodid	141
	N-Methyl-N'-1-(3-mercapto-propyl)-4,4'-bipyridinium-dijodid	142
5.5.5	Synthese Thiolmodifizierter Rotaxan-Elemente	144
	Thioessigsäure-S-(2-{2-[2-(4-{2-[2-(2-{4-[tris-(4-tert-butyl-phenyl)-methyl]-phenoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-phenoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethyl) ester	144
	2-(2-{4-[2-(2-{4-[Tris-(4-tert-butyl-phenyl)-methyl]-phenoxy}-ethoxy)-ethoxy]-phenoxy}-ethoxy)-ethanethiol	145
	Thioessigsäure-S-[2-(2-{4-[2-(2-{4-[tris-(4-tert-butyl-phenyl)-methyl]-phenoxy}-ethoxy)-ethoxy]-phenoxy}-ethoxy)-ethyl] ester	146
5.6	Ergänzende Messungen	148
5.6.1	Bestimmung der pKa-Werte von $\text{H}_3\text{N}^+-\text{Vio}^{++}-\text{NH}_3^+$ und $\text{H}_3\text{N}^+-\text{Vio}^+-\text{NH}_3^+$	148
5.6.2	pH-abhängige Stromantworten an blanken Goldelektroden	150
5.6.3	Cyclovoltammetrie von Ferrocenylethanol	151
6	Literaturverzeichnis	153
7	Abkürzungen	160

1 Allgemeine Einleitung

Das Studium biochemischer Wechselwirkungen mit oberflächensensitiven Techniken ist zu einem fundamentalen Bestandteil bioanalytischer Forschung geworden.^[1, 2]

Dies basiert zum einen darauf, dass die Methoden zur Modifikation von Oberflächen innerhalb der letzten 20 Jahre eine rasante Entwicklung erfahren haben.^[3, 4]

Die Selbstassemblierung gezielt synthetisierter Moleküle, insbesondere auf Gold- und Glasoberflächen, ermöglicht die Konstruktion von Schichten gewissermaßen auf molekularer Ebene. So können monoschichtige Immobilisierungsmatrizen generiert werden, welche die spezifische Fixierung von Biomolekülen ermöglichen, die in wohldefinierter Orientierung auf der Oberfläche ihre biologische Aktivität beibehalten.^[5, 6]

Zum anderen wurden verschiedenartigste oberflächensensitive Messtechniken mit immer grösseren Empfindlichkeiten verfügbar.^[7] Diese dienen einerseits der Charakterisierung biofunktionalisierter Oberflächen und leisten so einen entscheidenden Beitrag zur weiteren Entwicklung der Oberflächen-Modifikationstechniken. Ihre zentrale Bedeutung liegt in der Detektion biochemischer Wechselwirkungen. Die molekulare Erkennung von immobilisierten Biomolekülen und Liganden in Lösung bewirkt Änderungen von physikalischen Eigenschaften an der Grenzfläche, wie Brechungsindex^[8], Oberflächen-Plasmonenresonanz^[6], Masse^[9], Kapazität^[10, 11], etc. Dies wird mit den unterschiedlichen Transduktionsprinzipien in auswertbare elektrische Signale umgeformt. Durch die Untersuchung von Zeit- und Konzentrationsabhängigkeiten dieser Signale werden kinetische und thermodynamische Parameter von Affinitätsreaktionen zugänglich.

Rastersondentechniken wie AFM oder STM liefern darüber hinaus strukturelle Informationen bis hin zu submolekularer Auflösung.^[12, 13]

Von besonderem Interesse biochemischer Wechselwirkungen sind Interaktionen von Proteinen, wie Protein-Protein-, Protein-DNA- und Protein-Metabolit-Wechselwirkungen.

Oberflächen können auf verschiedene Weisen mit Proteinen funktionalisiert werden.

Der einfachste und weit verbreitetste Ansatz beruht auf der nichtspezifischen Adsorption der Biomoleküle^[7, 14]. Der Nachteil dieser Immobilisierungs-Strategien besteht in der Ausbildung von Schichten, in denen die Proteine in der Regel zufällig orientiert sind und oft durch unspezifische Wechselwirkungen mit der Oberfläche denaturiert werden. Durch kovalente Kupplung von Proteinen über exponierte reaktive Gruppen (Amine, Carboxylate) an komplementär-funktionalen Schichten können Proteine ebenfalls auf Oberflächen eingeführt werden. Je nach Vorhandensein und Zugänglichkeit entsprechender Gruppen können Proteine gerichtet, wenn auch irreversibel aufgebracht werden. Diesbezüglich existiert eine Vielzahl von chemischen Kupplungstechniken.

Durch molekularbiologische Modifikationen können Proteine mit sog. TAGs versehen werden.^[15] Dies sind kurzkettige Oligopeptide, die am NH₂- oder COOH-Terminus des interessierenden Proteins eingeführt werden können und eine hohe Affinität zu bestimmten Liganden aufweisen. So kann ein Protein unter Ausnutzung dieser Spezifität in einer bestimmten Orientierung auf einer Ligand-modifizierten, biokompatiblen Oberfläche immobilisiert werden.^[6]

1.1 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit werden insbesondere methodisch-messtechnische Probleme angegangen.

Wie aus der Literatur bekannt, können biomolekulare Wechselwirkungen an modifizierten Goldoberflächen erfolgreich mit optischen Signaltransduktionsmechanismen detektiert werden.^[6, 8] Dies soll im Rahmen dieser Arbeit in mikrogravimetrische und elektrochemische Varianten überführt werden.

Die unspezifische Adsorption von Proteinen auf modifizierten Goldoberflächen soll mikrogravimetrisch untersucht werden. Ein in der Literatur beschriebenes Oligoethylenoxid-terminiertes Alkylthiol^[8, 16] soll auf seine Eigenschaft hin geprüft werden, die unspezifische Adsorption von Proteinen zu reduzieren.

Zur reversiblen spezifischen Immobilisierung von Tag-Proteinen soll eine in der Literatur beschriebene, molekular monoschichtige Matrix^[6] zur Modifikation von Quarzmikrowaagen-Elektroden verwendet werden.^[16] Verschiedene Funktionen dieser Matrix, wie die Verdrängung eines immobilisierten Proteins durch einen konkurrierenden Liganden, die Unterbindung und Regeneration der spezifischen Bindung sollen auf der Quarzoberfläche realisiert werden. Es soll versucht werden, durch laterale Verdünnung spezifischer Protein-Bindungsstellen auch verdünnte Protein-funktionalisierte Oberflächen zu generieren. In Hinblick auf die Quantifizierung spezifischer Protein-Bindungsstellen soll ein elektrochemisches Detektionsverfahren an leitfähigen Glassubstraten entwickelt werden.

Im Verlauf dieser Arbeit erkannte man, dass Protein-Schichten, die unspezifisch auf Goldelektroden adsorbiert waren, das Verhalten von pH- und Ionen-abhängigen Elektronenschleusen aufweisen.^[17]

Die in Kapitel 3 dokumentierten elektrochemischen Untersuchungen dienen der mechanistischen Aufklärung dieses Phänomens.

2 Reversible spezifische Immobilisierung von His-TAG-Proteinen

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der reversiblen spezifischen Immobilisierung eines His-TAG-Proteins auf modifizierten ITO- und Goldelektroden.

Im Zusammenhang mit der Modifikation der ITO-Substrate wird ein neuartiger Redoxindikator vorgestellt, der es prinzipiell ermöglicht, die modifizierten Oberflächen zu charakterisieren und bezüglich der Dichte der spezifischen Protein-Bindungsstellen zu quantifizieren.

Die Synthese weiterer redoxaktiver Verbindungen zur Modifikation von Goldoberflächen wird dargestellt.

Als Modifikation für Quarzmikrowaagen-Goldelektroden diente eine von Whitesides et al.^[6] beschriebene Immobilisierungsmatrix.

Protein-Bindungsstudien wurden mit einer eigens entwickelten QCM-Kleinst-Volumen-Messzelle durchgeführt.

Es konnten wesentliche Funktionsprinzipien der Metallchelataffinitätschromatographie an der Sensoroberfläche untersucht werden, womit die prinzipielle Eignung der verwendeten Kombination von Sensortechnik und Oberflächenmodifikation für biochemische Affinitätsstudien demonstriert wurde.

2.1 Einleitung

2.1.1 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Innerhalb der chromatographischen Methoden zur Aufreinigung von Proteinen hat die von Porath et al. eingeführte Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie (engl.: "Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC)") besondere Bedeutung erlangt.^[18-20]

Das Funktionsprinzip dieser Aufreinigungstechnik beruht auf der Koordination zwischen bestimmten Aminosäure-Seitenketten auf der Oberfläche eines Proteins und dem Zentralion eines immobilisierten Übergangsmetallchelate-Komplexes auf einem Trägerharz.

Porath et al. verwendeten den dreizähligen Liganden Nitrilotriessigsäure, der über einen Spacer an Oxiran-aktivierte Agarose als festem Träger gekoppelt und dann für die Immobilisierung von Metallionen wie Ni^{2+} , Cu^{2+} oder Zn^{2+} verwendet wurde. Die entstehenden Metall-Chelat-Komplexe verfügen über freie Koordinationsstellen, welche von exponierten, frei zugänglichen Histidin-Seitenketten des Proteins koordiniert werden und so dessen Immobilisierung auf dem modifizierten Trägerharz bewirken. Adsorbierte Proteine können durch Zugabe von EDTA (löst das Schwermetall-Ion aus dem Chelatkomplex), Imidazol (verdrängt Protein aus der Koordinationssphäre) und Ansäuern (bewirkt Protonierung der Histidin-Seitenketten, die daraufhin nicht mehr koordinieren) wieder desorbiert werden.

2.1.2 His-TAG und Ni^{2+} -NTA

Durch Entwicklung neuer molekularbiologischer Techniken konnte die Aufreinigung von Proteinen entschieden verbessert werden. Das Konzept basiert auf der Herstellung von sogenannten Hybrid-Proteinen durch Fusion der DNA-Sequenz des gewünschten Proteins mit der Kodierungssequenz eines Proteins, welches eine hohe Affinität zu einem immobilisierten Metall-Chelat-Komplex hat – fortan als Affinitätsprotein oder TAG bezeichnet - und einer zusätzlichen Sequenz einer spezifischen Spaltungsstelle. Die Fusionsproteine werden unter Ausnutzung der spezifischen Bindung des Affinitätsproteins an das Adsorbens aufgereinigt. Nach der Aufreinigung kann das Affinitätsprotein an der spezifischen Spaltungsstelle abgetrennt werden. Diese allgemeine Methode zur Aufreinigung rekombinanter Proteine wurde mit verschiedenen Affinitätsprotein-Ligand Systemen demonstriert.^[21]

Hochuli et al. berichteten 1988 erstmals von einem kurzkettigen Affinitätspeptid, bestehend aus wahlweise fünf oder sechs Histidinen, dem sogenannten „His-TAG“.^[15, 21-23] Mit diesem His-TAG fusionierte Proteine zeigen eine bemerkenswerte Affinität zu Ni^{2+} -Metall-Chelat-Komplexen, die ebenfalls von Hochuli et al. ein Jahr zuvor entscheidend weiter entwickelt wurden.^[24]

Sie führten den vierzähligen Liganden N_α, N_α -Methylcarboxy-L-Lysin **9** ein, dargestellt durch zweifache Alkylierung der α -Aminogruppe des Z(ϵ)-geschützten Lysins **7** mit Bromessigsäure und anschließender Abspaltung der Z-Schutzgruppe durch Hydrierung an Pd / C unter Atmosphärendruck.

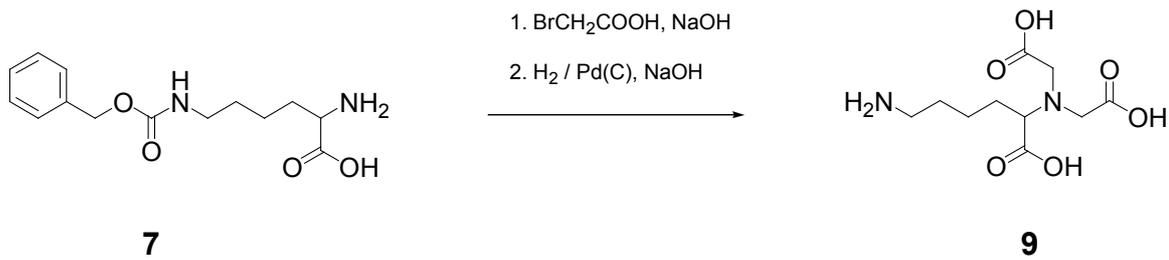


Abb. 2-1: Darstellung des Lysinderivates **9**, von dem Hochuli et al. 1987^[24] erstmals berichteten

Der NTA-Ligand **9** (Abb. 2-1) wurde an Epibromhydrin-aktivierte Sepharose gekoppelt und konnte nach Beladen mit Ni^{2+} für die Affinitätschromatographie eingesetzt werden. Im Vergleich zu den bis dahin verwendeten dreizähligen Iminodiessigsäure-Chelatbildnern, zeigt das Lysinderivat **9** wesentlich größeres Komplexierungsvermögen für Ni^{2+} .^[24]

Durch 1:1 Komplexierung besetzt das Lysinderivat **9** vier Positionen in der Koordinationssphäre des Ni^{2+} (Abb. 2-2).

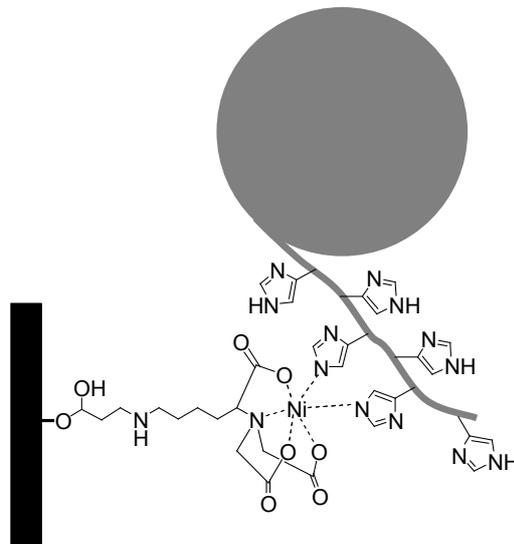


Abb. 2-2: Schematische Darstellung der Koordination eines His-TAG-modifizierten Proteins an den Ni^{2+} -NTA-Komplex auf modifizierter Sepharose

Es verbleiben zwei freie Ligandenpositionen in der oktaedrischen Koordinationssphäre des Zentralions, die für spezifische Wechselwirkungen mit benachbarten Histidinresten des Fusionsproteins verfügbar sind (Abb. 2-2).

Eine wichtige Voraussetzung für die Koordination des Fusionsproteins ist die richtige Orientierung der Histidinreste des His-TAGs, so daß eine geometrische Anpassung an die Koordinationssphäre des Zentralions erfolgen kann. Der His-TAG ist genügend konformationell flexibel, so dass durch die fünf bzw. sechs Histidinseitenketten stets die beiden freien Koordinationsstellen am Zentralion besetzt werden können und eine 2 His : 1 NTA–Stöchiometrie vorliegt.^[25] Die Bindungskonstante des [NTA-Ni²⁺-(His)₆]-Komplexes von etwa 3 μM^[26] bewirkt einerseits eine genügend starke spezifische Adsorption von His-TAG Proteinen. Andererseits ist diese nicht zu groß ist, so daß eine reversible Desorption der Proteine aus der Koordinationssphäre des chelatierten Ni²⁺ durch Verdrängung mit Imidazol erfolgt. Dies ermöglicht die chromatographische Aufreinigung von His-TAG-Proteinen.

Das von Hochuli et al. eingeführte His-TAG / Ni²⁺-NTA-System nimmt eine herausragende Stellung innerhalb der chromatographischen Aufreinigungstechniken von Proteinen ein.^[27]

2.1.3 Immobilisierung von His-TAG-Proteinen an Grenzflächen

Die Immobilisierung durch Koordination an Metall-Chelat-Komplexen entwickelte sich zu einer wichtigen Technik, His-TAG-modifizierte Proteine gezielt an Grenzflächen zu fixieren.

Man kuppelte den NTA-Chelator **9** an verschiedenartig modifizierte Oberflächen, wie z.B. silanisierte Glas- oder polymermodifizierte Goldoberflächen.^[28-32] Ebenfalls diente die Adsorption des NTA-modifizierten Enzyms Meerrettich-Peroxidase auf modifizierten Glasoberflächen der Einführung der Chelatorfunktion.^[33]

Es wurden Chelator-funktionalisierte Lipide und Alkanthiole^[6, 34-39] synthetisiert.

Die Selbstassemblierung chelatorfunktionalisierter Lipidmoleküle an der Grenzfläche Wasser / Luft bzw. die Selbstassemblierung chelatorfunktionalisierter Alkanthiole auf Goldoberflächen diente dem Aufbau hochgeordneter, molekular monoschichtiger Metallchelate-Matrizen.

Nach Beladen mit Ni^{2+} konnten His-TAG-Proteine reversibel an den verschiedenartig modifizierten Oberflächen immobilisiert werden. Derartig modifizierte Oberflächen dienten biochemischen Affinitätsstudien mit oberflächensensitiven Techniken^[6, 30, 32, 35, 40], der zweidimensionalen Proteinkristallisation^[41, 42] oder der Kraftspektroskopie an Einzelmolekülen.^[25, 43, 44]

Ein wichtiger Vorteil der His-TAG-Immobilisierung besteht in der nur geringfügigen chemischen Manipulation des Proteins durch Einführung des His-TAGs, so daß die Aktivität von His-TAG-Proteinen in der Regel nur geringfügig beeinträchtigt wird.

Weiterhin ermöglicht die Einführung des His-TAGs die Kontrolle der Orientierung des Proteins nach Immobilisierung durch gezielte Einführung am NH_2 -Terminus oder COOH -Terminus. Die Orientierung kann für die Aktivität des Proteins auf der Oberfläche von entscheidender Bedeutung sein.

Durch die Möglichkeit der vollständigen Regeneration der Oberflächen ist es möglich, eine Sensoroberfläche wiederholt für die Modifikation mit His-TAG-Proteinen zu verwenden.

2.1.4 EF₁-ATPase als Modellprotein für Bindungsstudien

Die universell vorkommende F₁-ATP-Synthase ist im Energiestoffwechsel lebender Organismen für die Synthese von ATP aus ADP und Phosphat zuständig.^[45]

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Protein aus *Escherichia Coli* handelt es sich um einen Teilkomplex des Holoenzym, welcher die katalytischen Zentren der ATP-Synthase enthält. Dieser globuläre F₁-Komplex hat eine molare Masse von 380 kD und einen molekularen Durchmesser von etwa 10 nm. Er besteht aus insgesamt 5 verschiedenen Untereinheiten (α , β , γ , δ , ϵ), von denen die Untereinheiten α und β in drei identischen Kopien abwechselnd hexagonal um die zentrale Untereinheit γ angeordnet sind.^[33, 45-47]

Als Modellprotein für Bindungsstudien an modifizierten ITO und QCM-Goldelektroden im Rahmen von Kapitel 2 diente eine Mutante¹ der EF₁-ATPase, die N-terminal an 3 β -Untereinheiten His-TAG-modifiziert war (Abb. 2-3).

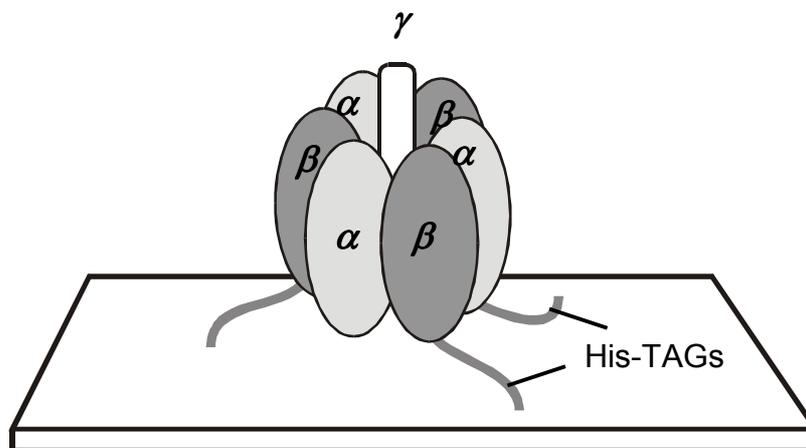


Abb. 2-3: Schematische Darstellung der mit 3 His-TAGs immobilisierten EF₁-ATPase-Mutante^[33], die Untereinheiten δ und ϵ sind nicht gezeigt.

¹ Mutationen:

Entfernung aller Cysteine, Ersatz durch Alanin / neues Cystein in γ K109C / His-TAGs N-terminal an allen 3 β -Untereinheiten / Mutation α D261N (Erniedrigung der ADN-Affinität in den nicht-katalytischen Bindungsstellen)

Die Mutante wurde von der Arbeitsgruppe Junge (Biophysik) der Universität Osnabrück zur Verfügung gestellt.

2.2 Modifikation von ITO-Substraten zur Immobilisierung von Proteinen

His-TAG-modifizierte EF₁-ATPase sollte auf ITO²-beschichteten Glasträgern immobilisiert werden. Dazu wurden die Substrate zunächst mit 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan **17** (Abb. 2-4) silanisiert.^[28] Der NTA-Chelator **9** wurde anschliessend durch nukleophile Öffnung des Epoxids mit der primären Aminogruppe an der Oberfläche fixiert. Nach Komplexierung von Ni²⁺ war die Oberfläche aktiviert für die spezifische Immobilisierung eines His-TAG modifizierten Proteins. His-TAG modifizierte EF₁-ATPase (siehe Kap. 2.1.4) konnte spezifisch auf ITO-beschichteten Mikroskopie-Glasträgern immobilisiert und in einem sog. Rotationsassay untersucht werden³.

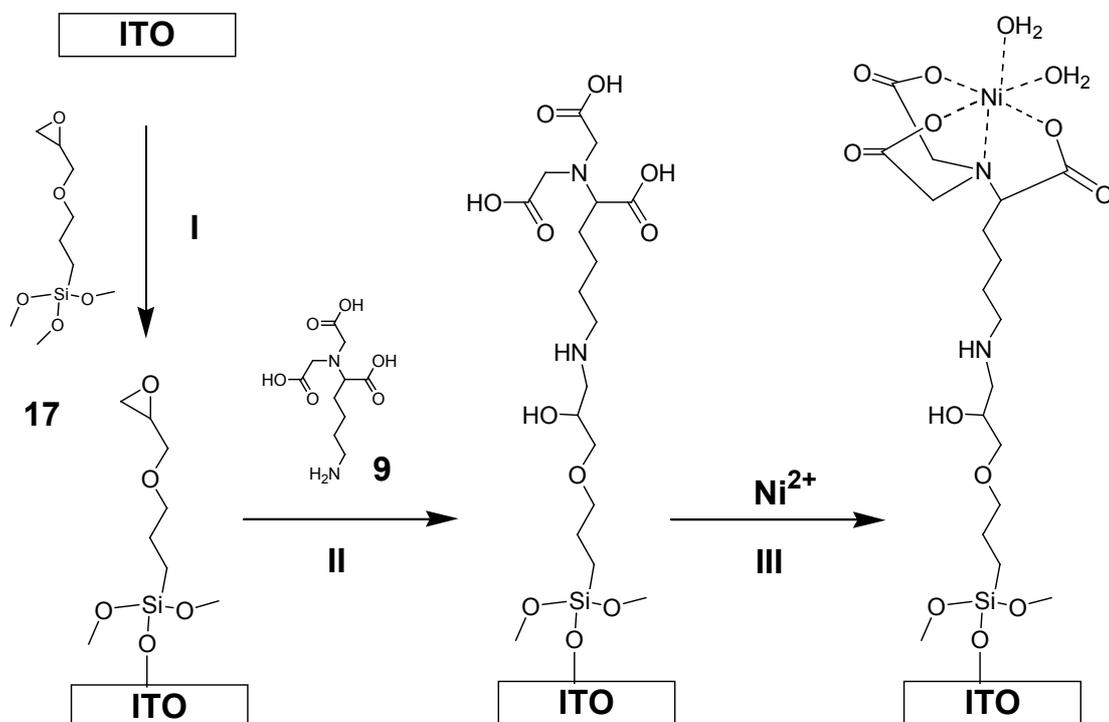


Abb. 2-4: Modifikation von ITO-Elektroden mit dem NTA-Chelator (I+II), Ni²⁺-Aktivierung (III);

I: 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan, 1 h, RT; II: 10 %ig NTA-Chelator (pH = 10), 16 h, 60 °C;

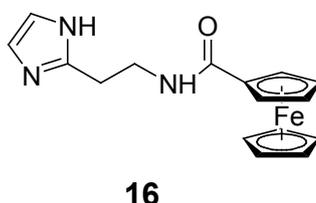
III: a) 10 mM NaOH, 10 min, b) 50 mM Ni₂SO₄, 1 h [19]

² ITO (engl. Indium Tin Oxide): Indium dotiertes Zinnoxid, welches als transparenter, elektrischer Leiter zur Beschichtung von Glassubstraten verwendet wird.

³ Oliver Pänke, Arbeitsgruppe Junge (Biophysik), Universität Osnabrück

2.2.1 Qualitätskontrolle von Metallchelate-modifizierten ITO-Substraten mittels einem Redoxindikator

Es war von Interesse, Ni^{2+} an der Oberfläche des modifizierten ITO-Substrats nachzuweisen. Dies sollte als Qualitätskontrolle der Modifikation und als Maß für die Dichte der spezifischen Protein-Bindungsstellen dienen. Der Versuch, Ni^{2+} direkt elektrochemisch zu detektieren, scheiterte. Durch Komplexierung mit einem redoxaktiven Liganden sollte das fixierte Ni^{2+} indirekt nachgewiesen werden. Imidazol koordiniert an chelatiertes Ni^{2+} , deshalb vermutete man, dass ein mit Ferrocen verknüpftes Imidazol **16** die Funktion des Redoxindikators erfüllen würde.



2.2.1.1 Synthese von Ferrocenmonocarbonsäurehistamid

Das Ferrocenmonocarbonsäurehistamid **16** wurde in einer zweistufigen Synthese dargestellt (Abb. 2-5). Ausgehend von einer Literatur-Vorschrift^[48] überführte man Ferrocenmonocarbonsäure mittels Isocyanurfluorid in das Fluorocarbonylferrocen. Nach chromatographischer Aufreinigung (Ausbeute: 68 %) setzte man **14** in DMF mit Histamin in Gegenwart von 4-Dimethylaminopyridin (4-DMAP) als Base direkt zum Zielmolekül **16** um und reinigte chromatographisch auf (Ausbeute: 55 %).

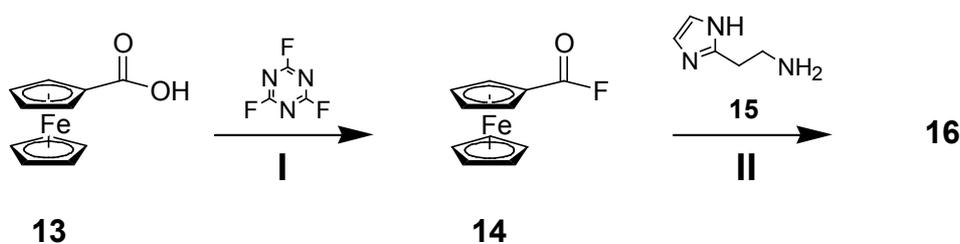


Abb. 2-5: I: CH_2Cl_2 , Pyridin, 0°C , 90 min; II: DMF, DMAP, 40°C , 1h

2.2.1.2 Elektrochemische Untersuchung von Ferrocenmonocarbonsäurehistamid

Nach 30 minütiger Inkubation der Ni^{2+} -modifizierten Elektrode in 1%iger wässriger Ferrocenmonocarbonsäurehistamid-Lösung spülte man mit wenig bidestilliertem Wasser und nahm ein CV in 0.1 M KCl auf (Abb. 2-6). Man beobachtete symmetrische Redoxwellen mit geringer Peakseparation von $\Delta E_p = 31 \text{ mV}$ (I). Offensichtlich koordiniert der Redoxindikator spezifisch an chelatiertem Ni^{2+} auf dem NTA-modifizierten ITO-Substrat. Die Integration der anodischen Redoxwelle lieferte eine Oberflächenkonzentration von $\Gamma_{16} = 3 \cdot 10^{-11} \text{ mol / cm}^2$ unter Annahme einer Ein-Elektronen-Oxidation des Ferrocenmonocarbonsäurehistamids. Nimmt man weiterhin eine molekulare Querschnittsfläche von etwa 1 nm^2 für **16** an, so gelangt man zu einer ca. 30%igen Bedeckung der Oberfläche⁴ mit dem Ferrocenmonocarbonsäurehistamid.

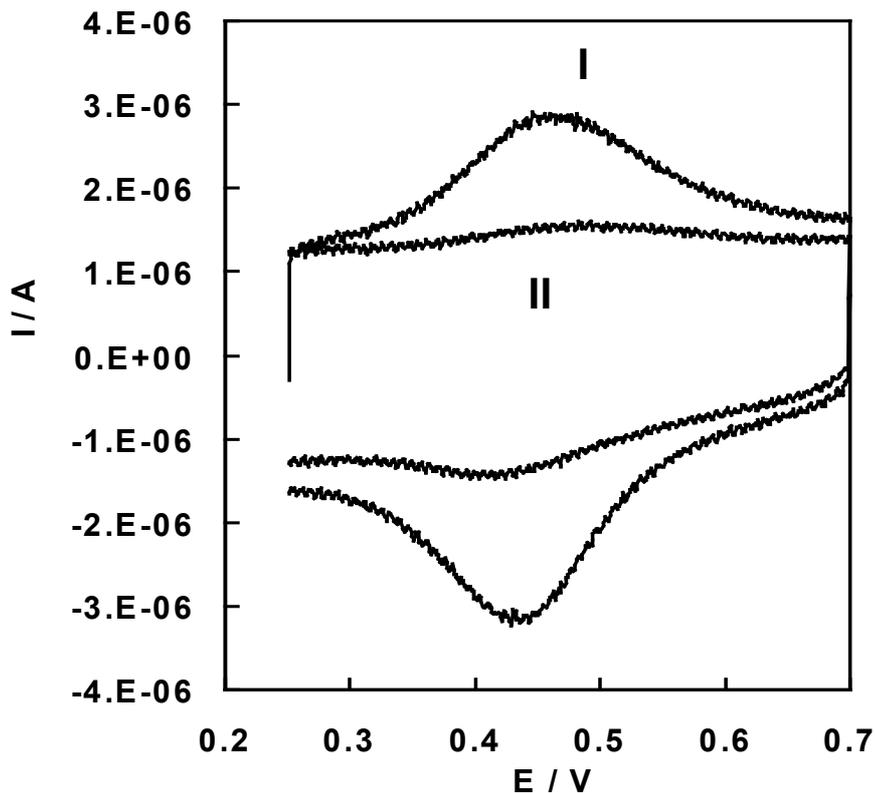


Abb. 2-6: CV der modifizierten ITO-Elektrode ($A = 1 \text{ cm}^2$) in 0.1 M KCl (pH = 7); E vs Ag/AgCl; $\nu = 0.1 \text{ V/s}$; (I): nach 30 min in 1%iger Lösung **16** von (II): + 30 min in 1%iger EDTA-Lösung

⁴ Die Rauigkeit der ITO-Oberfläche beträgt $r_{\text{ITO}} = 1.09$.

Anschließend legte man die Elektrode für 30 min in 1 % ige EDTA-Lösung, spülte mit bidestilliertem Wasser und nahm anschließend wieder ein CV auf (II).

Es wurde eine deutliche Abnahme (> 90 %) der Redoxsignale festgestellt.

Erneutes Einlegen der Elektrode in die Ni^{2+} - und Ferrocenmonocarbonsäurehistamid-Lösung bewirkte vollständige Regeneration der Redoxsignale (hier nicht gezeigt).

Eine nicht in die Ni^{2+} -Lösung eingelegte Elektrode zeigte kein Signal.

Somit ist Ferrocenmonocarbonsäurehistamid **16** prinzipiell geeignet, das fixierte Ni^{2+} indirekt nachzuweisen und damit die Dichte der spezifischen Protein-Bindungsstellen zu quantifizieren.

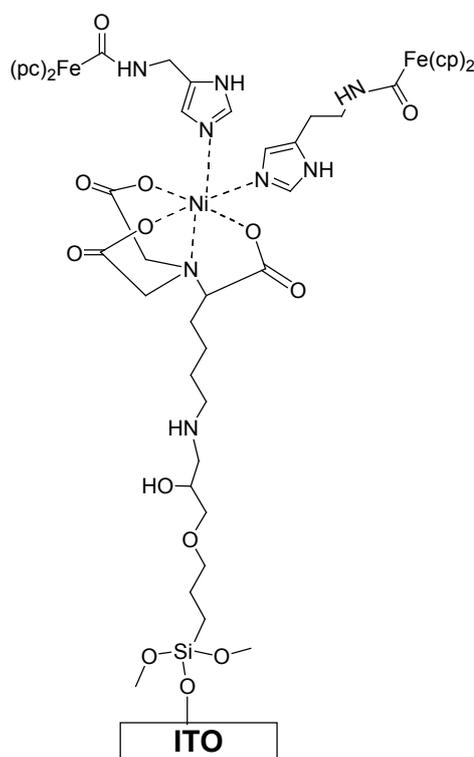


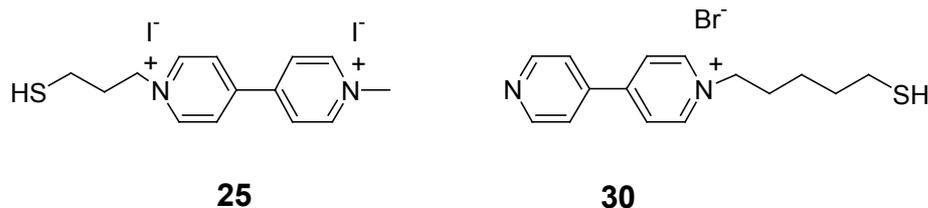
Abb. 2-7: Koordination von chelatiertem Ni^{2+} durch den Redoxindikator Ferrocenmonocarbonsäurehistamid **16** in hypothetischer 2:1- Stöchiometrie

2.2.2 Neuartige redoxaktive Verbindungen zur Modifikation von Goldoberflächen

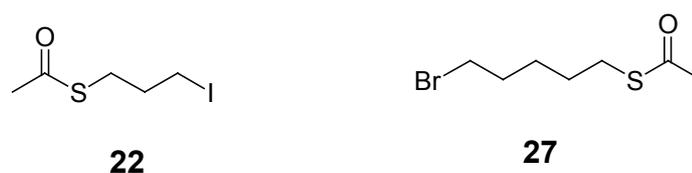
2.2.2.1 Mercaptoalkyl-derivierte Bipyridinderivate

Monoschichten mercaptoalkyl-derivierter redoxaktiver Bipyridinderivate auf Goldelektroden wurden erstmals von De Long und Buttry^[49] beschrieben. Eine Übersicht findet sich bei Yan.^[50]

Die neuartigen mercaptoalkylierten Bipyridinderivate N-Methyl-N'-1-(3-mercaptopropyl)-4,4'-bipyridinium-dijodid **25** und N-1-(5-Mercaptopentyl)-4,4'-bipyridiniumbromid **30** wurden im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert.



Die Einführung des Schwefels in die beiden Bipyridinderivate erfolgte durch Alkylierung des jeweiligen Bipyridinvorläufers mit den neuartigen Halogen-Thioessigsäureestern **22** bzw. **27**.



Thioessigsäure-S-(3-iodo-propyl)ester **22** erhielt man aus 1-Brom-3-Chlorpropan **20** durch Umsetzung mit Kaliumthioacetat in Ethanol (Abb. 2-8, I, nächste Seite). Dies bewirkte nukleophile Substitution des Bromids durch Thioacetat. Anschliessend setzte man den Chlorthioessigsäureester **21** mit NaI um (Abb. 2-8, II, nächste Seite) (Halogenidaustausch nach Finkelstein) (Gesamtausbeute: 50 %).

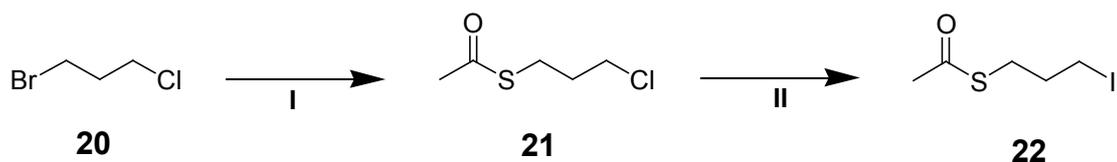


Abb. 2-8: Synthese-Schema für Thioessigsäure-S-(3-iodo-propyl)ester **22** ; I: AcOSK / EtOH, II: NaI / MeCN

Durch Alkylierung des Methylbipyridiniums mit **22** in einem Gemisch aus Acetonitril und Ethanol erhielt man N-Methyl-N'-1-(3-S-thioacetyl-propyl)-4,4'-bipyridinium-dijodid **24** in mässiger Ausbeute von 26 % (Abb. 2-9, I). Anschliessende saure Verseifung des Thioessigsäureesters **24** mit Acetylchlorid in Methanol lieferte das ViologenthioI **25** in befriedigender Ausbeute (64 %) (Abb. 2-9, II).

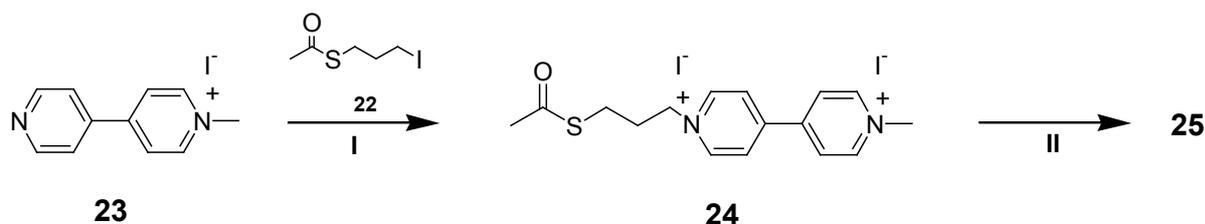


Abb. 2-9: Synthese Schema von N-Methyl-N'-1-(3-S-thioacetyl-propyl)-4,4'-bipyridinium-dijodid **24**;
I: MeCN / EtOH; II: ACOC1 / MeOH

Thioessigsäure-S-(5-bromo-pentyl)ester **27** wurde dargestellt durch Umsetzung von 1,5-Dibrompentan **26** mit Kaliumthioacetat in Methanol und anschliessender destillativer Aufreinigung (Abb. 2-10).

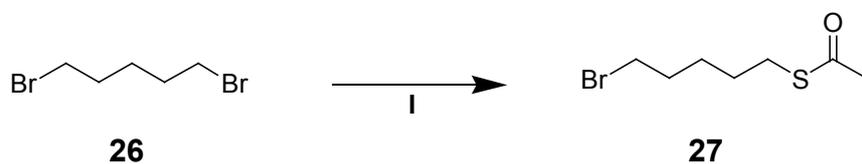


Abb. 2-10: Darstellung von Thioessigsäure-S-(5-bromo-pentyl)ester **27**; I: AcOSK / MeOH

Durch Alkylierung von Bipyridin **28** mit Thioessigsäure-S-(5-bromo-pentyl)ester **27** erhielt man N-Thioacetyl-pentyl-4,4'-bipyridinium-bromid **29** in mässiger Ausbeute von 26 % (Abb. 2-11, I, nächste Seite). Anschliessende saure Verseifung des Thioessigsäureesters **29**

mit Acetylchlorid in Methanol lieferte das N-1-(5-Mercaptopentyl)- 4,4'-bipyridiniumbromid **30** in sehr guter Ausbeute (95 %) (Abb. 2-11, II).

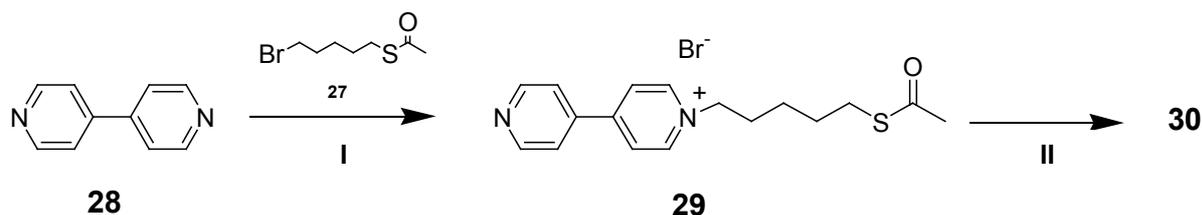


Abb. 2-11: Synthese Schema von N-1-(5-Mercaptopentyl)- 4,4'-bipyridiniumbromid **30**; I: MeCN / EtOH; II: ACOCI / MeOH

2.2.2.2 Neuartige Rotaxan-elemente zur Modifikation von Goldelektroden

Rotaxane (Abb. 2-12 A) bestehen aus einem fadenförmigen und einem aufgefädelt ringförmigen Molekül. Sog. Stopper auf beiden Seiten des fadenförmigen Moleküls verhindern das Ausfädeln der ringförmigen Komponente. Man spricht von einer mechanischen Bindung zwischen Faden- und Ring- Komponente.

Sog. Catenane (Abb. 2-12 B) bestehen aus zwei (oder mehreren) ineinander geschlossener Ringmoleküle.

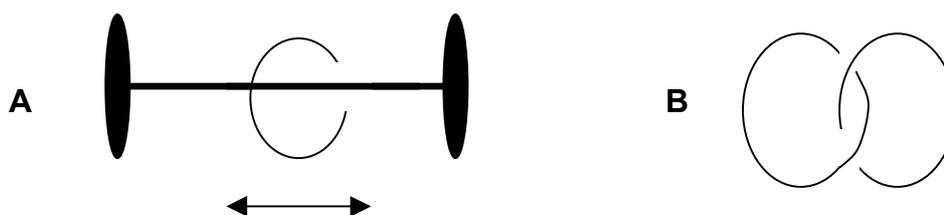
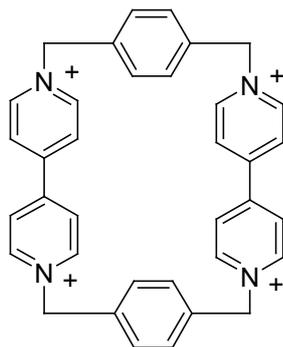


Abb. 2-12: Rotaxan (A) (mit Stoppnern und frei beweglicher ringförmiger Komponente) und Catenan (B)

Stoddart et al. führten neuartige Rotaxane ein, die Hydrochinon-Einheiten (sog. Stationen) auf der fadenförmigen Komponente enthalten und das Cyclophan **36**^[51] als ringförmige Komponente (Abb. 2-14). Verbindung **33** (siehe nächste Seite) enthält ein O-alkyliertes Hydrochinon als Strukturelement, welches ein pi-Akzeptor ist.

36

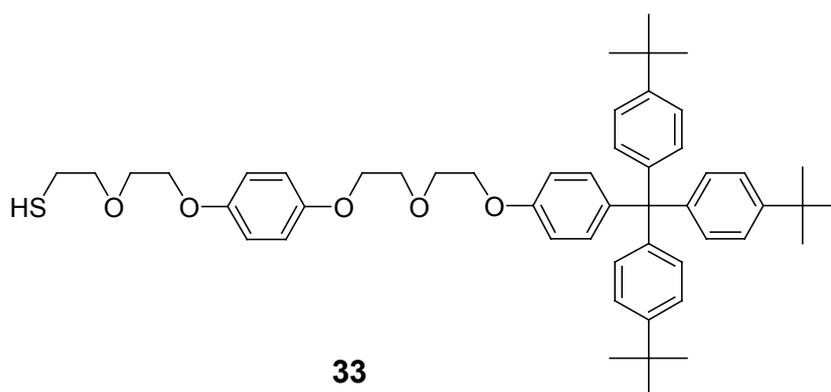
Durch pi-pi-Wechselwirkungen mit dem Cyclophan **36**, welches als pi-Donor fungiert, kommt es zur Ausbildung von Einschluss-Komplexverbindungen.

Durch elektrochemische Schaltbarkeit der Positionen zwischen unterschiedlichen Stationen auf einer fadenförmigen Komponente, welche das Cyclophan einnehmen kann, ergibt sich für derartige Rotaxane die Funktion molekularer, elektromechanischer Einheiten.^[52]

Aktuelle Übersichten zu dieser Art sog. „molekularer Maschinen“ geben Balzani et al.^[53, 54]

Lu et al.^[55] berichten erstmals von einem oberflächenfixierten Catenan auf Goldelektroden, aufgebaut aus Elementen von Stoddart-Typ Rotaxanen bzw. Catenanen.

In vergleichbarer Weise wurde im Rahmen dieser Arbeit ein oberflächenfixierbares Rotaxan konzipiert. Das neuartige, Thiol-modifizierte Rotaxanelement **33** zur Modifikation von Goldoberflächen wurde synthetisiert.

**33**

Die Synthese des Tosylats **31** erfolgte nach Literaturvorschriften^[56-58] (Abb. 2-13, I, nächste Seite). Die Einführung des Schwefelatoms in das Molekül erfolgte über nukleophile Substitution von Tosylat gegen Thioacetat. Umsetzung mit Kaliumthioacetat in Aceton lieferte den Thioessigsäureester **32** in guter Ausbeute (79 %) (Abb. 2-13, I). Die Reduktion mit LiAlH₄ in THF führte schliesslich zum Zielmolekül, Thiol **33** (Ausbeute: 43 %) (Abb. 2-13, II).

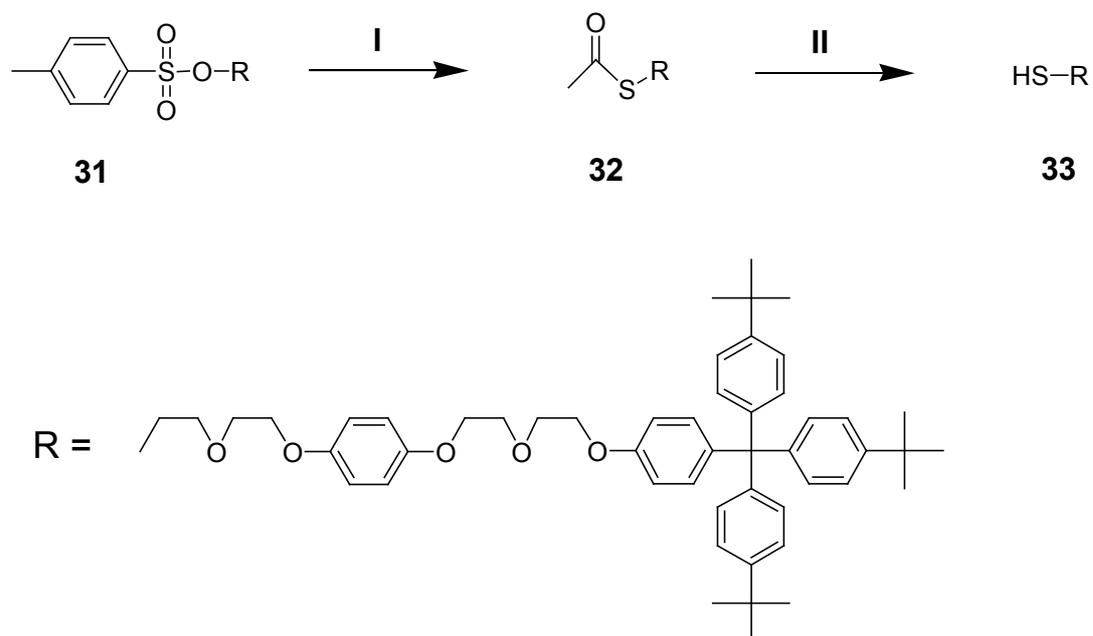
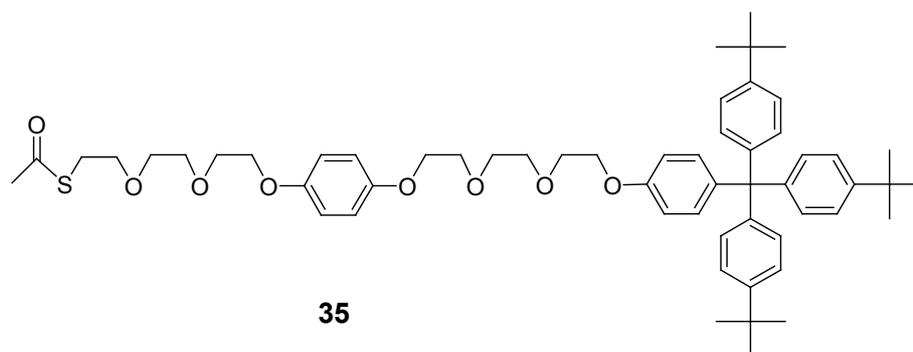


Abb. 2-13: Synthese-Schema von **33**; I: AcOSK / Aceton; II: LiAlH₄ / THF

Ebenfalls wurde der Vorläufer **35** des höheren Homologen dargestellt (Ausbeute: 88 %), analog der Darstellung von **32**.



Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich die Synthesen der Verbindungen durchgeführt.

Folgende Aspekte sind für zukünftige Untersuchungen von Interesse.

Das O-alkylierte Hydrochinon **33** ist ein pi-Akzeptor. Durch pi-pi-Wechselwirkungen mit dem Cyclophan **36**, welches als pi-Donor fungiert, kommt es zur Ausbildung von Einschluss-Komplexverbindungen. Es handelt sich hierbei um ein Semirotaxan, da nur ein Stopper an der fadenförmigen Komponente vorhanden ist. Durch Selbstassemblierung des Semirotaxans an einer Goldoberfläche wird die redoxaktive Cyclophan-Komponente durch eine mechanische Bindung an der Oberfläche fixiert. Sie ist entlang der Schiene frei beweglich. Der Stopper verhindert das Ausfädeln des Cyclophans (Abb. 2-14), während die Goldoberfläche gewissermaßen als zweiter Stopper fungiert.

Es ist es vorstellbar, das sich das Cyclophan diffusiv der Elektrode nähert und ein Elektron aufnimmt. Anschließende Diffusion in entgegengesetzte Richtung bewirkt Annäherung an die Lösung und ermöglicht Abgabe des Elektrons an einen Mediator in Lösung. Dementsprechend verhielte sich das oberflächefixierte Rotxan wie eine Elektronenpumpe. Es ist denkbar, dass derartige Rotaxane, in Lipid-Doppelschichten eingelagert, einen transmembranen Elektronentransfer bewerkstelligen könnten.

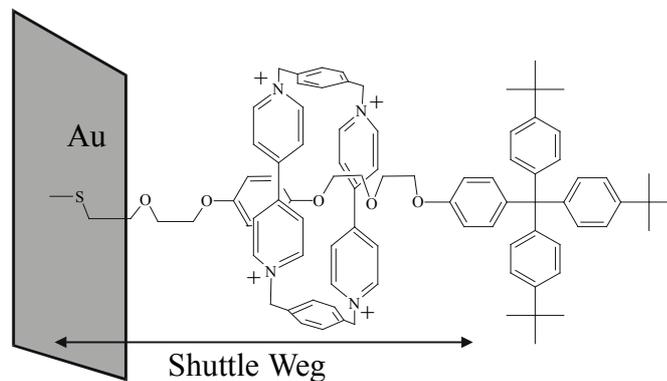


Abb. 2-14: oberflächenfixiertes Rotaxan, welches als Elektronenpumpe fungiert

2.3 Modifikation von QCM-Goldelektroden zur Immobilisierung von Proteinen

Whitesides et al.^[6] berichten von hochgeordneten molekularen Adsorbatschichten, die durch spontane Selbstassemblierung eines Gemisches der beiden Thiole **5** und **12** (Abb. 2-14) auf Goldoberflächen gebildet wurden⁵ und die reversible spezifische Immobilisierung von His-TAG-Proteinen ermöglichten (siehe auch Abb. 2-15, nächste Seite).

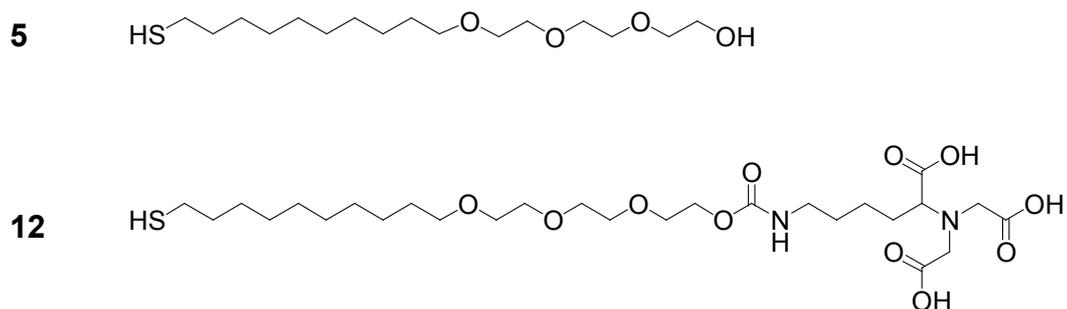


Abb. 2-14: Strukturen der Thiole 12 und 5, die zum Aufbau der selbstassemblierten Monoschicht verwendet wurden

Sie verwendeten die Adsorbatschicht zur Modifikation von Sensoroberflächen für die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (wie sie im BIAcore eingesetzt werden).^[29, 59] Die Adsorbatschicht wird im Folgenden auch als Immobilisierungsmatrix oder gemischte Monoschicht bezeichnet.

Die Selbstassemblierung ermöglicht die Modifikation der Goldoberfläche in einem Schritt^[6, 39] im Gegensatz zur stufenweisen Modifikation des ITO-Substrates^[28], gemäß Kap. 2.2.

⁵ Aufgrund der starken, kovalenten S-Au-Bindung bilden Alkanthiole, -disulfide und -sulfide sehr stabile Monoschichten, die durch zusätzliche van der Waals Wechselwirkungen unter den Adsorbatmolekülen zur Ausbildung dicht gepackter, hoch geordneter Monoschichten führen. Die Präparation erfolgt in einfacher Weise durch Immersion eines frisch gereinigten Goldsubstrats in eine Lösung des Adorbats für wenige Minuten bis zu mehreren Stunden und anschließendem intensivem Spülen des Substrats, um physisorbiertes Material zu entfernen.

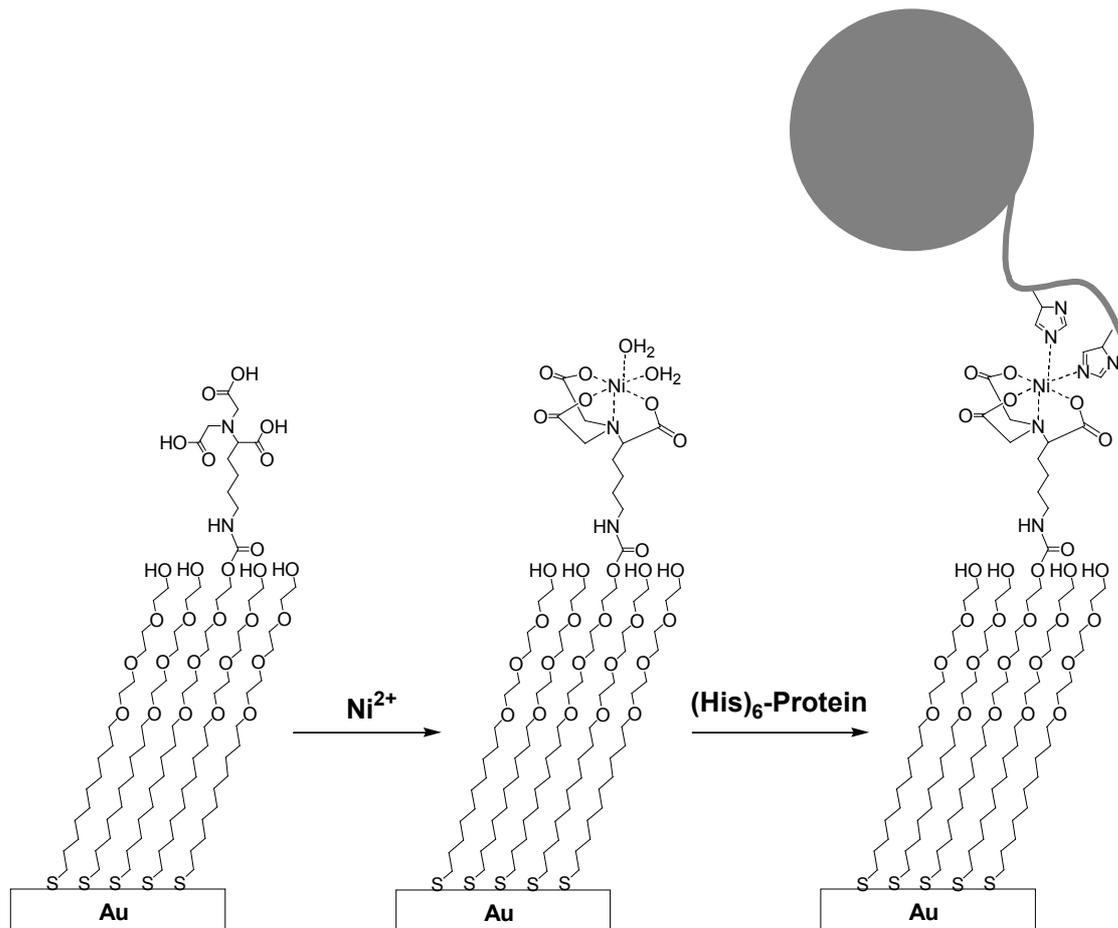


Abb. 2-15: SAM-Modifikation zur reversiblen spezifischen Immobilisierung eines His-TAG-Proteins nach Ni^{2+} -Chelatierung

In der Monoschicht auf einer Goldoberfläche assembliert (Abb. 2-15), kommen den beiden Molekülen folgende Funktionen zu: Thiol **12** ist endständig mit dem NTA-Chelator **9** funktionalisiert und eignet sich nach Komplexierung von Ni^{2+} zur reversiblen Immobilisierung His-TAG-modifizierter Proteine. Thiol **5** exponiert Triethylenglykol auf der Oberfläche und unterbindet die nichtspezifische Adsorption von Proteinen ^[16, 34, 60-62], die tendentiell an jeder blanken Festkörperoberfläche spontan adsorbieren. Damit kann Thiol **5** auch als lateraler Verdünner verwendet werden. Eine laterale Verdünnung kann erforderlich sein, wenn in der im folgenden Schritt generierten Proteinschicht Abstände zwischen den einzelnen Biomolekülen vorhanden sein sollen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Monoschicht erstmals zur Modifikation von Quarzmikrowaagen-Goldelektroden verwendet.⁶

⁶ zur QCM-Messtechnik siehe Kap. 5.1.1

2.3.1 Synthese der Matrix-Thiole

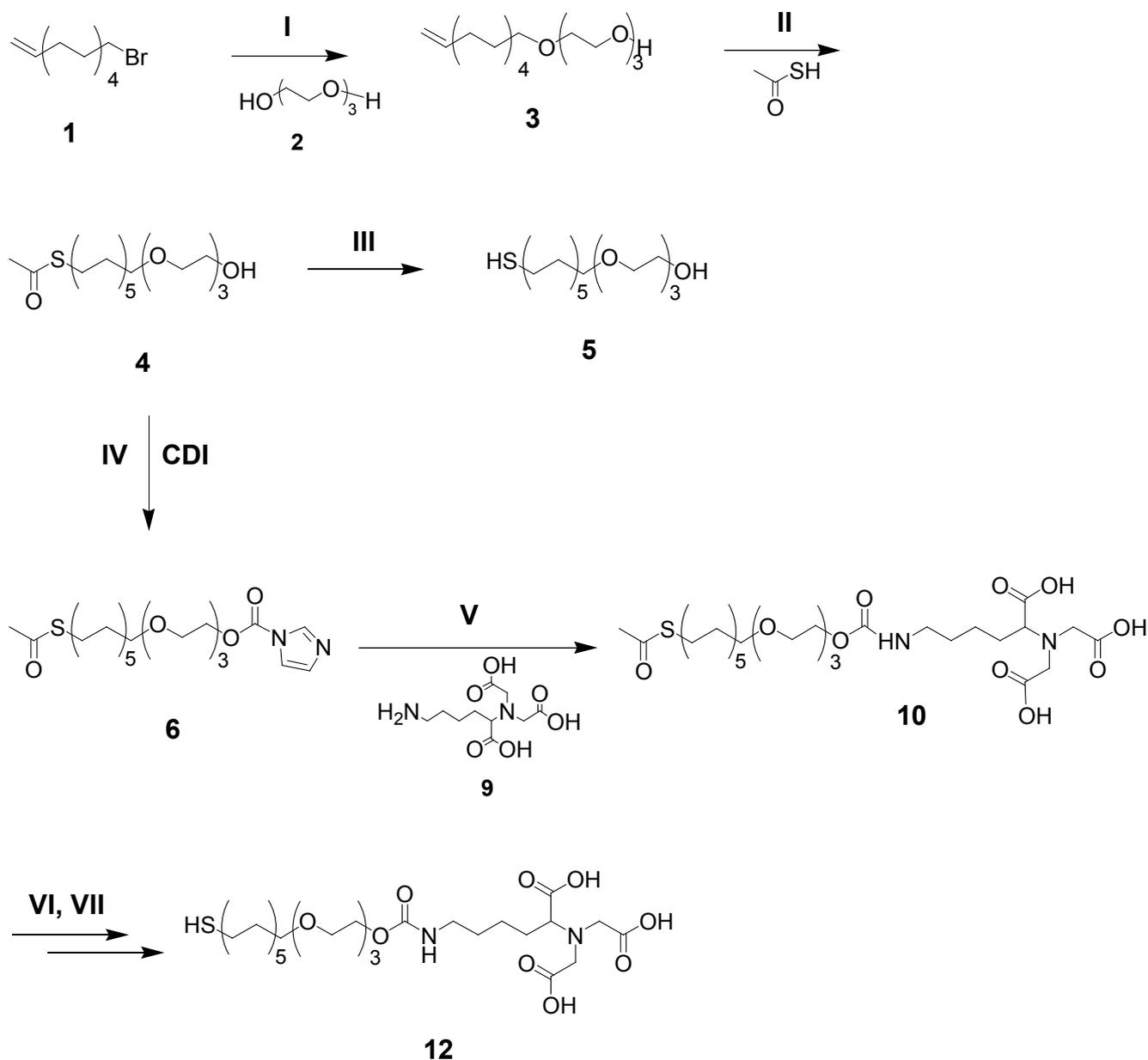


Abb. 2-16: Synthese-Schema für die beiden Matrix-Thiole

I. (EG)₃OH; 50% NaOH ; **II.** MeOH, HSOAc, kat. AIBN, hv; **III.** ClOAc / MeOH;
IV. CH₂Cl₂, CDI (Carbonyldiimidazol); **V.** H₂O / DMF, pH = 10.3 ;**VI.** MeOH, pH = 12 ;
VII. MeOH, P(Et)₃, N₂

Die Synthese (Abb. 2-16, vorherige Seite) erfolgte nach Literaturvorschriften^[6, 25], die für einzelne Stufen modifiziert wurde, was im Folgenden entsprechend gekennzeichnet ist.

11-Bromundec-1-en liefert den Alkylstamm beider Moleküle und ist neben der Mercaptofunktion von wesentlicher Bedeutung für die Selbstassemblierung zu hochgeordneten Monoschichten auf Goldoberflächen.⁷

Im ersten Schritt (**I**) wurde kommerziell erhältlichliches **1** mit Triethylenglykol **2** in 50 % iger Natronlauge umgesetzt. Durch Verwendung eines fünffachen Überschusses von Triethylenglykol wurde eine mögliche Zweifachalkylierung effizient unterdrückt. Man erhielt den Triethylenglykolmonoalkenylether **3** nach säulenchromatographischer Aufreinigung in befriedigender Ausbeute (57 %).

Die Einführung des Schwefels in das Molekülgerüst erfolgte anschließend (**II**) durch Addition der aciden und damit elektrophilen Thioessigsäure an die endständige Doppelbindung des Alkenylethers **3**. Durch Verwendung von α,α' -Azoisobutyronitril (AIBN) unter Einstrahlung von UV-Licht⁸ verläuft die Addition nach radikalischem Mechanismus, so dass der Schwefelsubstituent an C₁ und das Wasserstoffatom an C₂ addiert. In der Tat liess sich das unerwünschte Additionsprodukt im Rohprodukt mit ¹H-NMR *nicht* nachweisen. Man erhielt den Thioessigsäureester **4** nach säulenchromatographischer Aufreinigung in guter Ausbeute (78 %).

Dieses zentrale Intermediat **4** wurde einer sauren Verseifung (**III**) unterworfen, durch Rückflussieren in einer frisch hergestellten Lösung von Essigsäurechlorid in Methanol, und diente so der Darstellung des Thiols **5** in guter Ausbeute (85 %). Alternativ wurde durch Umsetzung von **4** mit Carbonyldiimidazol in Dichlormethan (**IV**) der Thioessigsäureester **4** in das Carbonylimidazolid **6** überführt. Die Reaktion erforderte säulenchromatographische Aufreinigung und verlief mit zufriedenstellender Ausbeute (71 %).

Im nächsten Schritt (**V**) erfolgte die Umsetzung des NTA-Lysinderivates **9** mit dem Carbonylimidazolid **6**. Die Reaktion wurde in einem DMF : Wasser-Gemisch bei pH = 10.2 durchgeführt. In diesem Milieu sind die beiden hinsichtlich ihrer Polarität deutlich verschiedenen Edukte und auch das Produkt gut löslich. Weiterhin stellt der alkalische

⁷ Aus der Literatur [6] ist bekannt, dass erst ab Alkylkettenlängen von $\geq C_{10}$ Alkanthiole derartige Strukturen in höchster Ordnung ausbilden. Kürzere Kettenlängen zeigen ein mitunter deutlich erhöhtes Maß an Unordnung, welches ebenfalls durch bestimmte funktionelle Gruppen in ω -Position des Adsorbatmoleküls verursacht werden und dann auch unabhängig von der Länge der Alkylkette sein kann.

⁸ Die Reaktion wurde im Gegensatz zur Literatur (Pyrex-Kolben mit Hg-Lampe) in einem Duranglaskolben mit einer Xenon-Lampe durchgeführt.

pH-Wert sicher, dass die primären Aminogruppen zum grössten Anteil deprotoniert sind und damit in der reaktiven Form vorliegen. Da sich bei der anschliessenden extraktiven Aufarbeitung nicht trennbare Emulsionen bildeten, ging man abweichend von der Synthesevorschrift gemäß Literatur^[6, 25] vor. Zuerst wurde bei alkalischem pH-Wert mit Diethylether ausgeschüttelt, wodurch sich das relativ hydrophobe Edukt **6** vom Reaktionsgemisch abtrennen liess. Anschliessend extrahierte man im Sauren (pH = 1.5) mit Ethylacetat. Die Tendenz zur Emulsionsbildung wurde dadurch deutlich vermindert. Man erhielt **10** in mässiger Ausbeute von 35 %.

Die folgende alkalische Verseifung (**VI**) des NTA-Thioessigsäureesters **10** führte man in Abweichung von der Literaturvorschrift^{9 [6, 25]} in alkalischer methanolischer Lösung durch nach einer Vorschrift von Poudrel et al.^[63, 64] Nach extraktiver Aufarbeitung erhielt man einen Feststoff, bei dem es sich gemäß ¹H-NMR um ein Disulfid / Thiol-Gemisch handelte. Zur Reduktion des Disulfid-Anteils wurde das Gemisch mit Triethylphosphin in einem THF-Wasser-Gemisch reduziert. In einer Gesamtausbeute der beiden letzten Stufen von 24 % erhielt man das Thiol **12**.

2.3.1.1 Synthese des NTA-Chelators

In Abweichung¹⁰ zur Literaturvorschrift^[24] verwendete man für die Alkylierung des z-geschützten Lysinderivates **7** (siehe Abb. 2-1) einen ca. dreifachen Überschuss an Bromessigsäure zur Steigerung der Ausbeute. Massenspektroskopisch liess sich im Reaktionsgemisch weder Edukt **7** noch einfach alkyliertes Produkt nachweisen, sondern ausschliesslich das gewünschte zweifach alkylierte.¹¹ Dementsprechend war das Lysinderivat **7** quantitativ umgesetzt. Die Umfällung bewirkte eine effiziente Aufreinigung von **8**. Anschliessende Hydrierung über Pd / C im Alkalischen lieferte einen quantitativen Umsatz. Das Produkt wurde als 10% ige alkalische Lösung (pH =10, eingestellt mit 50 %iger NaOH) für die Darstellung des NTA-Thioessigsäureesters **10** weiter verwendet.

⁹ Die Durchführung gemäss Literaturvorschrift scheiterte.

¹⁰ In der Literatur wird ein zweifacher Überschuss an Bromessigsäure verwendet.

¹¹ Unter gleichen Messbedingungen beobachtete man den Massenpeak des Edukts nach Hinzufügen zur Probe.

2.4 Impedanzspektroskopische Qualitätskontrolle der Oberflächenmodifikation

QCM-Goldelektroden wurden mit der selbstassemblierten, gemischten Monoschicht (gemäß Kap. 2-3) modifiziert (siehe Kap. 5.2).^[6] Direkt nach Modifikation wurden die Substrate in die Kleinst-Volumen-Messzelle eingebaut und zur Qualitätskontrolle der selbstassemblierten Monoschicht¹² mit einem platinieren Platindraht ($l = \text{ca. } 1 \text{ cm}$, $d = 0.5 \text{ mm}$) als Gegenelektrode impedanzspektroskopisch charakterisiert (siehe Kap. 5.1.3).^[65-67] Die deutlich größere Oberfläche verleiht dem platinieren Platindraht eine vielfach größere Kapazität, die gegenüber der modifizierten QCM-Elektrode vernachlässigbar wird. Das Impedanzspektrum der Zwei-Elektroden-Anordnung wird im Wesentlichen durch die elektrischen Eigenschaften der modifizierten QCM-Goldelektrode bestimmt.

Alle folgenden Messungen im Rahmen von Kapitel 2 wurden in einer Pufferlösung¹³ ($\text{pH} = 7$) durchgeführt, die fortan als Puffer A bezeichnet wird.

Zur Auswertung der Impedanzspektren formuliert man ein elektrisches Ersatzschaltbild für das zu untersuchende elektrochemische System. Die elektrischen Eigenschaften einer selbstassemblierten Alkanthiol-Monoschicht auf einer Goldoberfläche, die in einen Elektrolyt exponiert ist, werden im wesentlichen durch eine Reihenschaltung von Kapazität und Widerstand (Ersatzschaltbild: $(C_M R_{EI})$) beschrieben (Abb. 2-17).

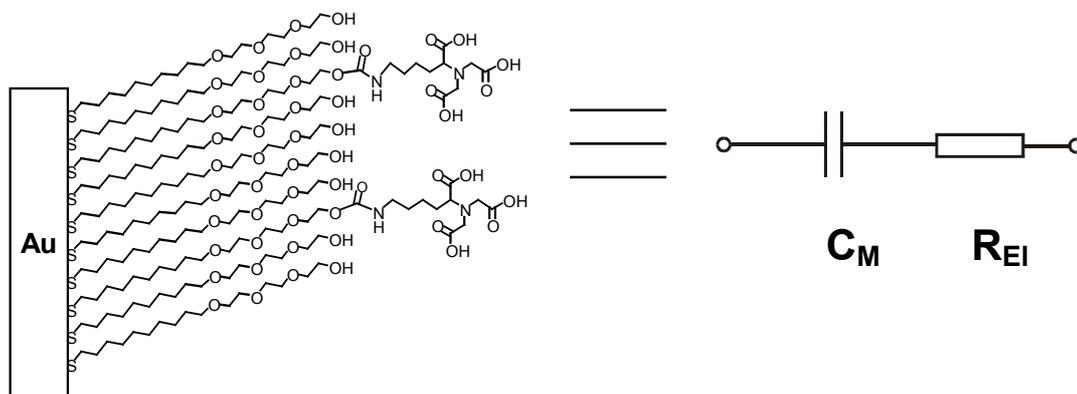


Abb. 2-17: Ersatzschaltbild ($C_M R_{EI}$) zur Beschreibung der SAM-modifizierten Elektrode; C_M : Kapazität der modifizierten Elektrode; R_{EI} : Elektrolytwiderstand

¹² Selbstassemblierte Monoschichten sind in der Regel nicht perfekt gepackt (entspr. 100 % gleichmäßiger Bedeckung) und weisen einen mehr oder weniger grossen Anteil an mikroskopischen Defekten auf.

¹³ Puffer A : 50 mM KCl, 20 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS), 5 mM MgCl_2 , $\text{pH} = 7$

Der Widerstand R_{EI} wird durch das ohmsche Verhalten der Elektrolytlösung verursacht, während C_M der Kapazität der modifizierten Elektrode entspricht.

Die ermittelten Kapazitäten C_M dienen als Maß für die Qualität der Modifikation (gleichmäßige, vollständige Bedeckung der Goldoberfläche).

Eine nicht-lineare Kurvenanpassung (non-linear-least-square-fit), die mittels der FRA (engl. Frequency Response Analyzer)-Software durchgeführt wurde, ermöglichte die Anpassung der Elemente des aufgestellten Ersatzschaltbildes an die Messdaten und lieferte die, das elektrochemische System charakterisierenden Parameter.

Als Beispiel ist das Impedanzspektrum einer QCM-Goldelektrode ($A = 0.34 \text{ cm}^2$), modifiziert mit einer Immobilisierungsmatrix ($x_{(12)} = 0.05$) aufgeführt, einschließlich der linearen Kurvenanpassungen (Abb. 2-18).

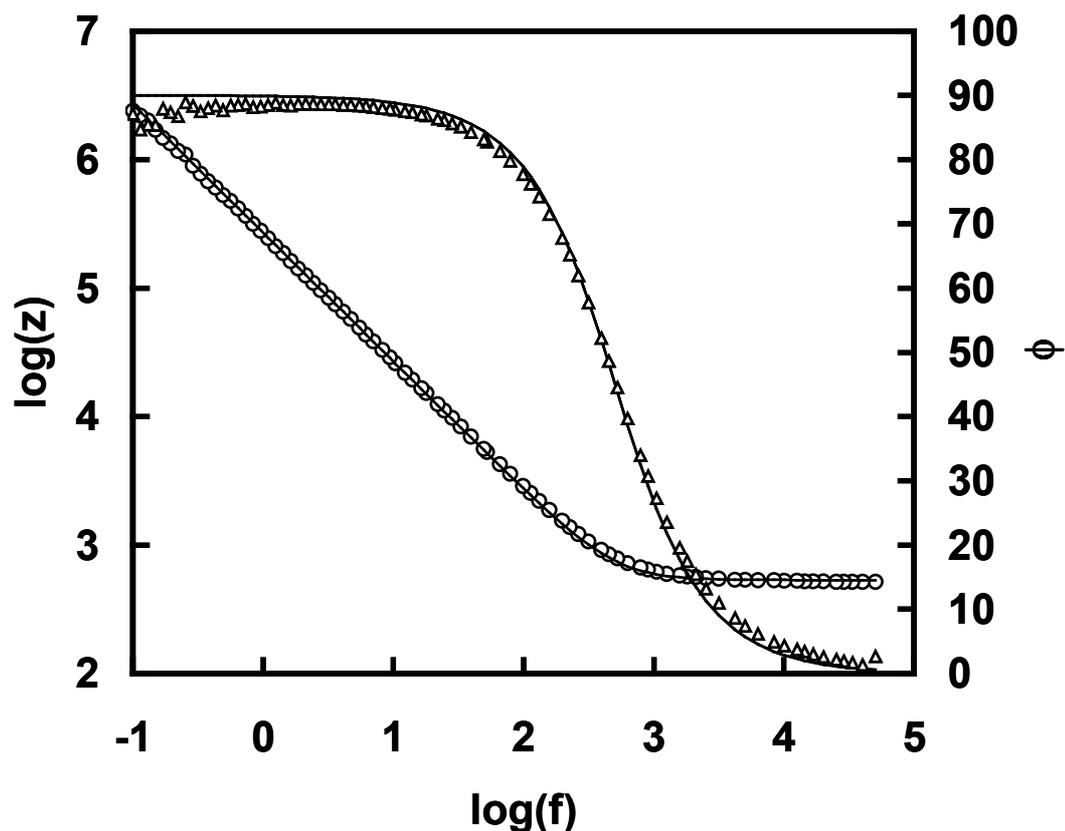


Abb. 2-18: Impedanzspektrum ($\log(z)$ (Logarithmus der Impedanz) und Phasenverschiebung Φ als Funktionen der Frequenz einer QCM-Goldelektrode ($A = 0.34 \text{ cm}^2$), modifiziert mit einem gemischten SAM ($x_{(12)} = 0.05$), gemessen gegen platinieren Platindraht in Puffer A. Die durchgezogenen Linien sind die Ergebnisse der Anpassung der Parameter des Ersatzschaltbildes ($C_M R_{EI}$); $C_M = 1.74 \mu\text{F} / \text{cm}^2$; $R_{EI} = 533 \Omega$;

Gemäß Whitesides et al.^[6] entspricht das Verhältnis von Thiol **12** zu Thiol **5** in der Inkubationslösung im wesentlichen dem Verhältnis der beiden Moleküle in der Monoschicht. Die ermittelten Kapazitäten sind unabhängig von der Zusammensetzung der gemischten Monoschicht in dem untersuchten Konzentrationsbereich und streuen um einen Mittelwert von $(1.69 \pm 0.08) \mu\text{F} / \text{cm}^2$ (Abb. 2-19). Dieser Wert entspricht dem Literaturwert^[65] der Kapazitäten von Alkanthiol-Monoschichten auf Gold mit vergleichbarer C-Kettenlänge (C_{11}).

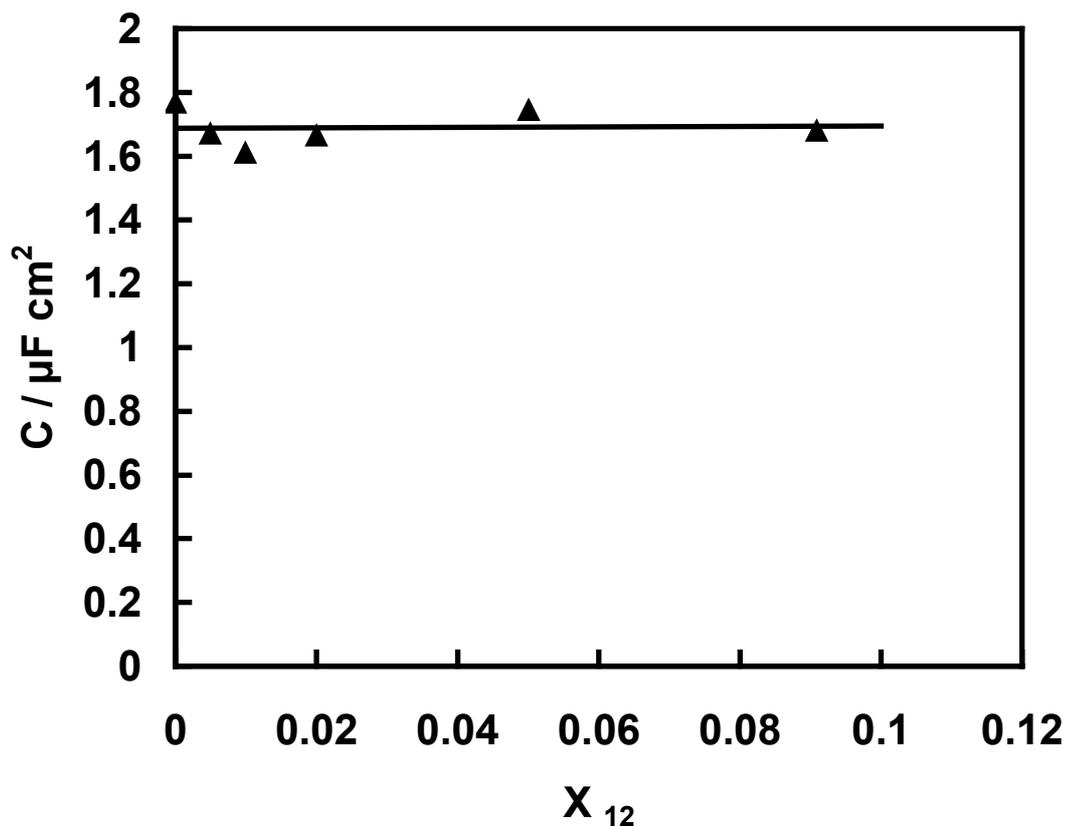


Abb. 2-19: Kapazitäten von modifizierten (Immobilisierungsmatrix) QCM-Goldelektroden ($A = 0.34 \text{ cm}^2$), ermittelt durch Kurvenanpassung des Ersatzschaltbildes (C_{MREI}) an die zugehörigen Impedanzspektren als Funktion des Molenbruchs x_{12} von Matrix-Thiol 12 in der Inkubationslösung, gemessen in Puffer A; $E = 0 \text{ mV}$, Amplitude: 40 mV

Im Vergleich hierzu lieferte eine Tetradekan-modifizierte QCM-Goldelektrode eine Kapazität von $1.247 \mu\text{F} / \text{cm}^2$.

In jedem Fall zeigen sich deutlich kleinere Kapazitäten als an einer blanken Goldelektrode C_{dl} ($\sim 30\text{-}50 \mu\text{F} / \text{cm}^2$).^[68]

Die Kapazität C_{dl} einer blanken Goldelektrode in einer Elektrolyt-Lösung wird durch die Helmholtz-Doppelschicht der adsorbierten Ionen verursacht. Eine auf der Goldelektrode

adsorbierte Monoschicht führt zu einer weiteren Kapazität C_M in Serie mit C_{dl} an der Grenzfläche. Da C_{dl} ($\sim 30\text{-}50 \mu\text{F} / \text{cm}^2$) $\gg C_M$ ($\sim 1\text{-}4 \mu\text{F} / \text{cm}^2$) wird die Gesamtkapazität durch die Kapazität der Monoschicht C_M bestimmt. C_M hängt reziprok linear von der Dicke d der Monoschicht ab, gemäß Gleichung (2.1).^[68]

$$d = \epsilon_0 \epsilon_r \cdot (C_M)^{-1} \quad (2-1)$$

mit d : Dicke der Monoschicht [$\text{m} \cdot 10^{-4}$]; ϵ_0 : Dielektrizitätskonstante des Vakuums [$8.9 \cdot 10^{-12} \text{ F} / \text{m}$]; ϵ_r [relative Dielektrizitätszahl]; C_M [$\mu\text{F} / \text{cm}^2$]

Die Kapazität der Monoschicht ist im Gegensatz zur Kapazität der blanken Goldelektrode prinzipiell unabhängig vom Elektrolyt und der Elektrolyt-Konzentration.

Geht man davon aus, dass die Kapazität C_M der Immobilisierungsmatrix im wesentlichen durch die Dicke der Alkan-Schicht (C_{11}) determiniert ist, so zeigen die gefundenen Kapazitäten eine gleichmäßig dichte, monoschichtige Modifikation der Oberfläche für jeden Molenbruch.

2.5 Reversible spezifische Immobilisierung von His-TAG-EF₁-ATPase

Es wurden Bindungsstudien von His-TAG-EF₁-ATPase an modifizierten QCM-Goldelektroden durchgeführt. Hierzu verwendete man die eigens entwickelte Kleinst-Volumen-Messzelle (siehe Kap. 5.1.1.2). Nach impedanzspektroskopischer Charakterisierung (Kap. 2.4) wurden die modifizierten QCM-Goldelektroden direkt für Protein-Bindungsstudien verwendet.

2.5.1 Unterdrückung der unspezifischen Adsorption

In Abb. 2-20 sind drei übereinandergelagerte Frequenzverläufe verschiedenartig modifizierter QCM-Goldelektroden abgebildet, die jeweils nach Einfüllen von EF₁-ATPase-Lösung und anschließendem Spülen mit proteinfreiem Puffer A¹⁴ aufgezeichnet wurden.

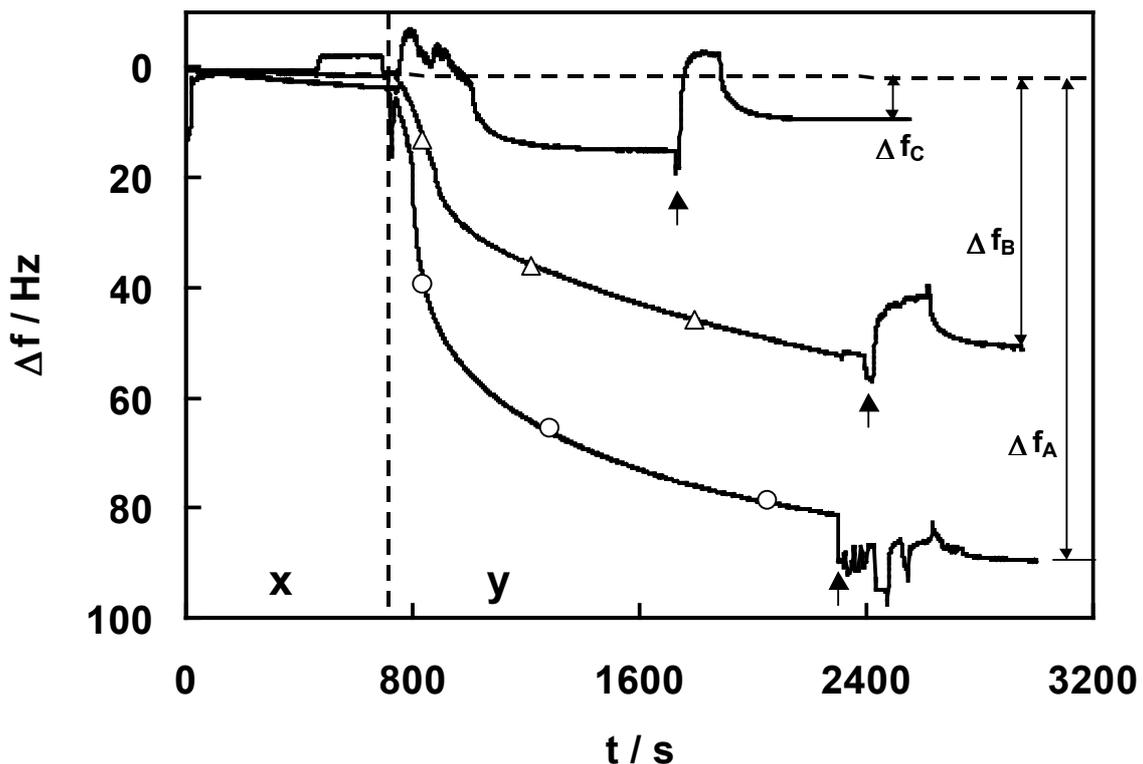


Abb. 2-20: übereinandergelagerte Frequenzverläufe von drei unterschiedlich modifizierten 5 MHz-Quarzresonatoren nach Füllen der Kleinst-Volumen-Messzelle mit $33 \cdot 10^{-9}$ M EF₁-ATPase und anschließendem Spülen mit proteinfreiem Puffer A¹⁴;

Kreise: blankes Gold; Dreiecke: Tetradekanthiol; C: Thiol 5; ----(vert.): Proteinzugabe

¹⁴ Puffer A (entsprechend Kap. 2.4): 50 mM KCl, 20 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS), 5 mM MgCl₂, pH = 7

Konkret wurde jeweils wie folgt verfahren: nachdem sich Frequenzstabilität der mit Puffer A gefüllten Messzelle eingestellt hatte (x), führte man einen vollständigen Volumenaustausch mit 1 ml $33 \cdot 10^{-9}$ M EF_1 -ATPase-Lösung (y; Start: vertikale Linie) durch und stoppte den Durchfluss. Man wartete erneut eine stabile Frequenz ab, spülte die Messzelle mit 2 – 3 ml proteinfreier Pufferlösung (Start: gekennzeichnet mit Pfeil), stoppte wiederum den Durchfluss und wartete erneute konstante Frequenz ab.

Nach jeweiligem Einfüllen der Protein-Lösung in die Kleinst-Volumen-Messzelle zeigten sich an den drei unterschiedlich modifizierten QCM-Goldelektroden deutlich voneinander abweichende Frequenz-Verläufe.¹⁵ Während die blanke und die Tetradekanthiol-modifizierte QCM-Goldelektrode etwa eine halbe Stunde nach Beginn des Einfüllens der Proteinlösung erneute Frequenzstabilität erreichten, war der mit Thiol **5** modifizierte Resonator bereits nach etwa 10 min wieder stabil. Nach anschließendem Spülen mit proteinfreier Pufferlösung und Frequenz-Stabilisierung waren folgende Gesamt-Frequenzabnahmen für die einzelnen Resonatoren zu beobachten:

- blankes Gold: $\Delta f_A = 90$ Hz
- Tetradekan-modifiziertes Gold: $\Delta f_B = 51$ Hz
- Mit Thiol **5** modifiziertes Gold: $\Delta f_C = 10$ Hz

Die Frequenzverläufe spiegeln die unspezifische, irreversible Adsorption der EF_1 -ATPase an die verschieden modifizierten Oberflächen wieder.

Der molekulare Durchmesser von EF_1 -ATPase beträgt etwa 9 nm.^[47] Eine dicht gepackte Schicht der Moleküle auf der Resonatoroberfläche hat nach den unter Kapitel 3.3 getroffenen Überlegungen (siehe Gleichung 3-3) eine theoretische areale Massendichte von $\Delta \Gamma_{m, th} = 0.87 \mu\text{g cm}^{-2}$. Gemäss Sauerbrey-Gleichung (siehe Kap. 3, Gleichung 3-1) führte die Adsorption einer solchen Schicht (ohne Einschluss von Wasser) zu einer Frequenzänderung von $\Delta f_{th} = 49$ Hz.

Dieser Wert ist in sehr guter Übereinstimmung mit der gemessenen Frequenzänderung $\Delta f_B = 51$ Hz des Tetradekanthiol-modifizierten Resonators, so dass man hier von der Ausbildung einer EF_1 -ATPase-Monoschicht ausgehen kann. Die Frequenzänderung an der blanken QCM-Goldelektrode weist auf die Ausbildung von Multischichten hin, eventuell

¹⁵ Alle Frequenzabnahmen sind zu Beginn (etwa 60 s) durch die Durchmischungskinetik (Volumenaustausch) verzögert.

initiiert durch Denaturierung des Proteins aufgrund der Wechselwirkung mit der Goldoberfläche.

Generell adsorbieren Proteine spontan an Festkörperoberflächen.^[14] Die Adsorption auf Gold wird begünstigt durch exponierte Amino- und Thiolgruppen auf der Oberfläche des Proteins. Ebenfalls spielen hydrophobe Wechselwirkungen eine Rolle. Diese erklären auch die Adsorption der EF₁-ATPase an die Tetradekan-modifizierte Resonatoroberfläche.

In der Literatur^[16, 34, 60-62] wird berichtet, dass Thiol **5** eine beträchtliche Unterbindung der unspezifischen Adsorption von Proteinen bewirkt.

So konnten Whitesides et al.^[6, 8] an mit Thiol **5** modifizierten Goldsubstraten mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR, engl. Surface Plasmon Resonance) und Ellipsometrie vollständige Unterdrückung der Adsorption verschiedener Proteine beobachten.

Die in Abb. 2-14 gezeigte, deutlich reduzierte Frequenzabnahme (90 % Reduktion in Bezug auf Δf_A bzw. 80 % Reduktion in Bezug auf Δf_B) des mit Thiol **5** modifizierten Resonators bestätigt dies.

Die Reduktion der unspezifischen Protein-Adsorption, d.h. der Protein-*Substrat*-Wechselwirkung, ist von fundamentaler Bedeutung für das Studium von Protein-*Protein*-Wechselwirkungen mit oberflächensensitiven Techniken.

2.5.2 Adsorption / Desorption-Zyklus

Für die im Folgenden gezeigten Messungen wurden monoschichtige Immobilisierungsmatrizen (gemischte SAMs aus den Thiolen 5 und 12) zur Modifikation von QCM-Goldelektroden verwendet. Nach impedanzspektroskopischer Charakterisierung wurden die modifizierten QCM-Goldelektroden direkt für Protein-Bindungsstudien verwendet.

Abbildung 2-21 (nächste Seite) zeigt den Verlauf von Frequenz- und Resonanzwiderstandssignal eines modifizierten Resonators ($x_{(12)} = 0.005$) in Abhängigkeit der Folge verschiedener Probelösungen, mit denen die Kleinst-Volumen-Messzelle gefüllt wurde. Die gestrichelten, vertikalen Linien markieren Zeitintervalle, in denen die Messzelle mit den entsprechenden Probelösungen gefüllt war.

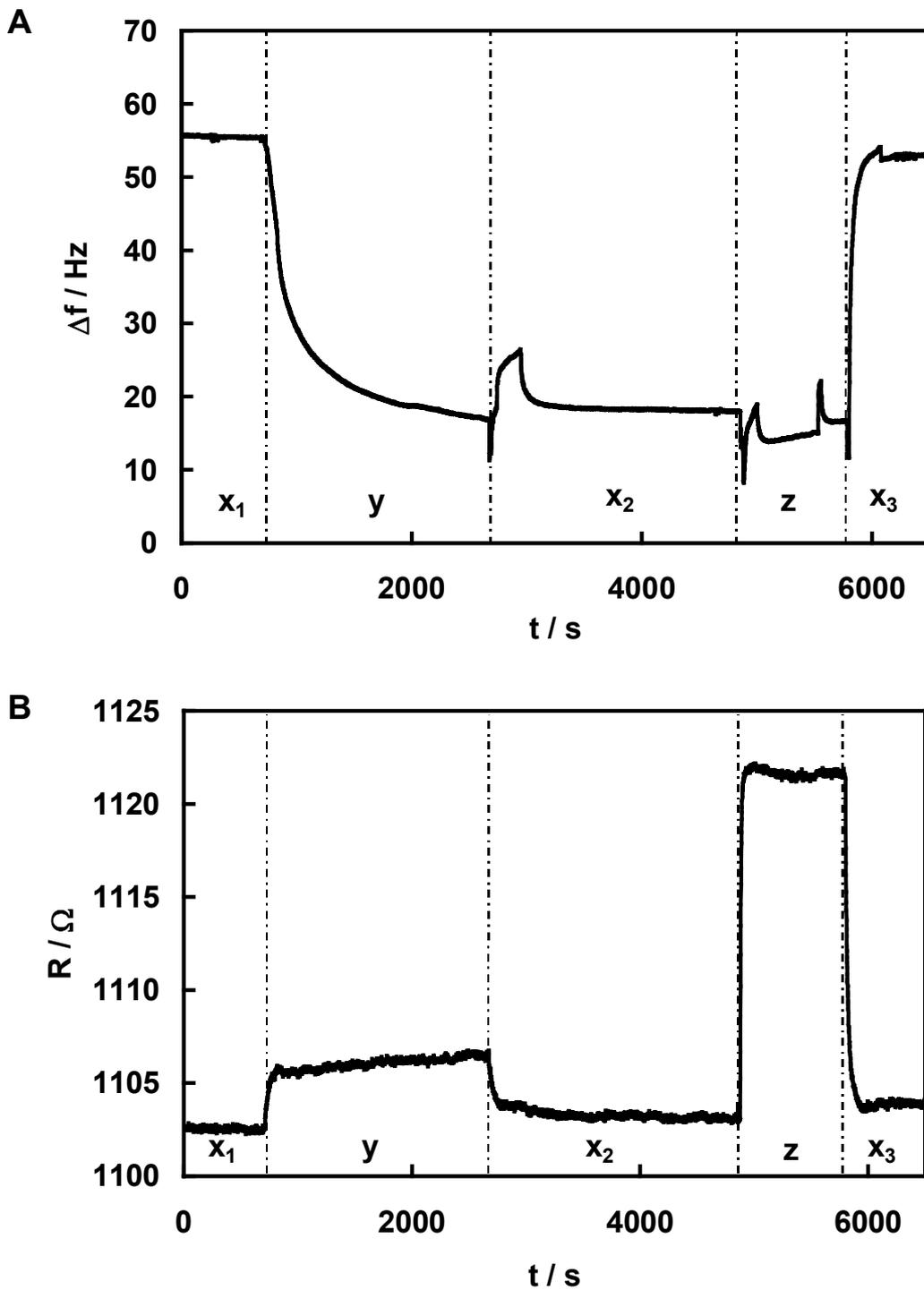


Abb. 2-21: Verlauf von Frequenzsignal (A) und Resonanzwiderstand (B) eines modifizierten Quarzresonators (Immobilisierungsmatrix, $x_{12} = 0.005$) in Abhängigkeit der Sequenz verschiedener Probelösungen zur Füllung der Kleinst-Volumen-Messzelle;

$x_{1,2,3}$: Puffer A; y : $33 \cdot 10^{-9}$ M EF_1 -ATPase in Puffer A; z : 0.5 M Imidazol in Puffer A

Es erfolgte jeweils zu Beginn eines Intervalls Volumenaustausch mit mindestens 1 ml der Probelösung unter konstantem Durchfluss, der anschliessend gestoppt wurde, um eine neue Signalkonstanz abzuwarten.

Nachdem sich zu Beginn der Messung (x_1) im stationären Modus ein konstantes Frequenzsignal (**A**) der mit proteinfreier Pufferlösung gefüllten Messzelle eingestellt hatte, spülte man vorsichtig mit 1 ml einer $33 \cdot 10^{-9}$ M EF_1 -ATPase-Pufferlösung (**y**) und stoppte dann den Durchfluss. Die Frequenz nahm unmittelbar mit dem ersten Einfließen der Proteinlösung in die Messzelle ab, um nach weiteren ca. 2000 s unter Erniedrigung von 38 Hz einen neuen konstanten Wert anzunehmen.

Die Frequenzabnahme spiegelt die Adsorption von EF_1 -ATPase auf der modifizierten Goldoberfläche wider.

In demselben Zeitintervall zeigte der Resonanzwiderstand (**B**) zunächst eine sprunghafte, dann eine kontinuierliche langsame Zunahme um insgesamt ca. 4 Ohm, die auf Dämpfung durch die Lösung (sprunghafter Anstieg) und durch adsorbierendes Protein (langsamer Anstieg) zurückgeführt wird.

Anschließend erfolgte Volumenaustausch durch proteinfreie Pufferlösung entsprechend der oben beschriebenen Verfahrensweise (x_2). Bereits wenige Sekunden nach Stoppen des Durchflusses stellte sich eine stabile Frequenz (**A**) ein. Die leichte Abnahme um 1 Hz kann möglicherweise durch Desorption von schwach physiosorbiertem Protein verursacht worden sein. Währenddessen nahm der Resonanzwiderstand (**B**) zunächst sprunghaft, dann weiterhin langsam ab, um einen gegenüber dem Ausgangs-Resonanzwiderstand (x_1) etwa 0.5 Ohm kleineren Wert anzunehmen. Die Dämpfung des Resonators durch die adsorbierte Proteinschicht wird, aufgrund dieser nur geringfügigen Änderung, als vernachlässigbar klein betrachtet. Es wird von einem Mitschwingen der Adsorbatschicht in Phase mit dem Quarz ausgegangen.

Die fortwährende Konstanz des Frequenzsignals (**A**) in diesem Zeitintervall (x_2) deutet auf eine stabile Fixierung des Proteins an der Oberfläche hin.

Nachdem das Frequenzsignal länger als eine halbe Stunde konstant war, spülte man ausgiebig mit 0.5 M Imidazol in Puffer A (**z**) (ca. 5 ml) und regenerierte die Messzelle, ohne erneute Frequenzstabilität abzuwarten, direkt mit Puffer A (x_3) (ebenfalls ca. 5 ml).

Imidazol verdrängt bei genügend hoher Konzentration das His-TAG-modifizierte Protein aus der Koordinationssphäre des chelatierten Ni^{2+} und bewirkt Desorption des Proteins, während das Metallion an der Oberfläche fixiert bleibt. Die vergleichsweise hohe Konzentration des Imidazols verursacht eine starke Dämpfung des Resonators, verursacht durch einen Dichte-

und Viskositätsanstieg der Messlösung, was sich in einem sprunghaften Anstieg des Resonanzwiderstands niederschlägt. Der Verlauf des Frequenzsignals (**A**) ist in diesem Bereich (**z**) nicht interpretierbar, da sich die Desorption des Proteins als frequenzerhöhender Prozess und die Dämpfung durch Viskositäts- und Dichteanstieg der Lösung als frequenzerniedrigender Prozess überlagern.

Anschliessendes Spülen mit reiner Pufferlösung bewirkt eine Rückkehr der Frequenz auf ihren Ausgangswert und indiziert die Regeneration der Sensoroberfläche.

Der Adsorption / Desorption-Zyklus zeigt, das His-Tag modifizierte EF₁-ATPase *stabil* und *reversibel* an der modifizierten Oberfläche immobilisiert werden kann.

Dies ist in Abb. 2-23 schematisch dargestellt.

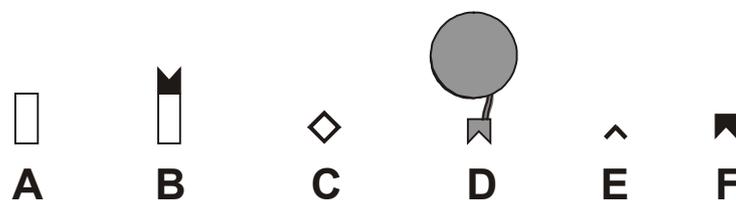


Abb. 2-22: Erläuterung der verwendeten Symbole zu schematischen Darstellungen in folgenden Abbildungen
A: Thiol **5**; B: Thiol **12**; C: Ni²⁺; D: His-TAG-Protein; E: Imidazol; F: EDTA

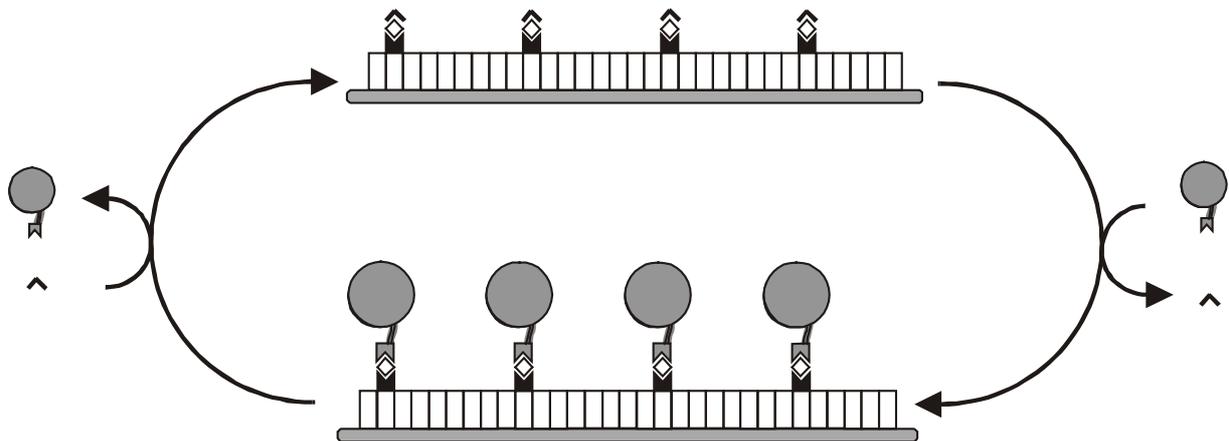


Abb. 2-23: Schematische Darstellung der reversiblen spezifischen Immobilisierung eines His-TAG-Proteins an der Immobilisierungsmatrix; A: Thiol **2**; B: NTA-Thiol; C: Ni²⁺; D: His-TAG-Protein; E: Imidazol; F: EDTA

2.5.3 Deaktivierung und Regeneration der spezifischen Bindung

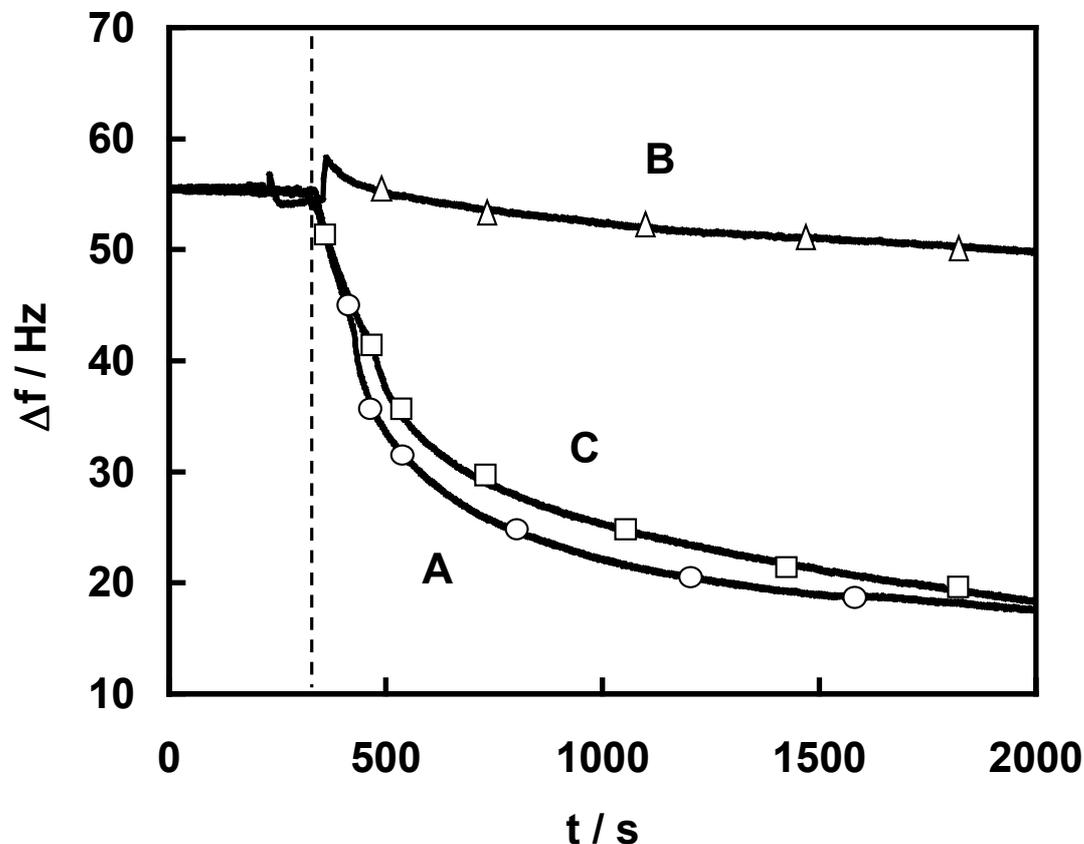


Abb. 2-24: Übereinandergelegte Frequenzverläufe bei Zugabe (---, vert.) von EF_1 -ATPase-Pufferlösung an einem modifizierten Quarzresonator (Immobilisierungsmatrix, $x_{12} = 0.005$); Kreis: bei erstmaligem Füllen mit Proteinlösung; Dreieck: Füllen mit Proteinlösung nach 30 min Inkubation in 0.1 M EDTA-Pufferlösung; Quadrat: Füllen mit Proteinlösung nach erneuter Inkubation in a) 10 mM NaOH, 10 min und b) 50 mM $NiSO_4$

Der Frequenzverlauf A (Kreise) in Abb. 2-24 spiegelt die erste Adsorption der His-TAG-markierten EF_1 -ATPase an einer frisch modifizierten Sensoroberfläche wieder (übernommen aus Abb. 2-15 A, (y)). Nach der bereits erläuterten Regeneration dieser Oberfläche durch Imidazol- und Pufferspülen wurde 30 min 0.1 M EDTA-Pufferlösung in der Messzelle stehen gelassen und anschließend wieder mit Puffer A gespült. Dann erfolgte Volumenaustausch mit $33 \cdot 10^{-9}$ M EF_1 -ATPase-Pufferlösung. Es zeigte sich eine deutlich verminderte Frequenzabnahme von etwa 6 Hz, entsprechend dem Signalverlauf B (Dreiecke).

EDTA bildet mit dem Ni^{2+} noch stabilere Komplexe als NTA und löst das Schwermetallion aus dem Chelatkomplex von der Oberfläche. Folglich bindet das Protein nicht mehr spezifisch an die Oberfläche.

Nach erneutem Spülen mit Imidazolösung und Puffer A inkubierte man 5 min mit 1 mM NaOH und anschliessend 1 h mit 50 mM wässriger Nickelsulfatlösung. Man spülte die Messzelle mit Puffer A und anschliessend mit $33 \cdot 10^{-12}$ M EF₁-ATPase-Pufferlösung. Man beobachtete eine Abnahme der Frequenz entsprechend dem Frequenzverlauf C (Quadrate), der in guter Übereinstimmung mit dem Frequenzverlauf A ist und zur gleichen Frequenzerniedrigung von $\Delta f = 38$ Hz führt.

Nach erneutem Beladen der Oberfläche mit Ni²⁺ war die modifizierte Sensor-Oberfläche für die spezifische Bindung der EF₁-ATPase vollständig regeneriert (Abb. 2-25).

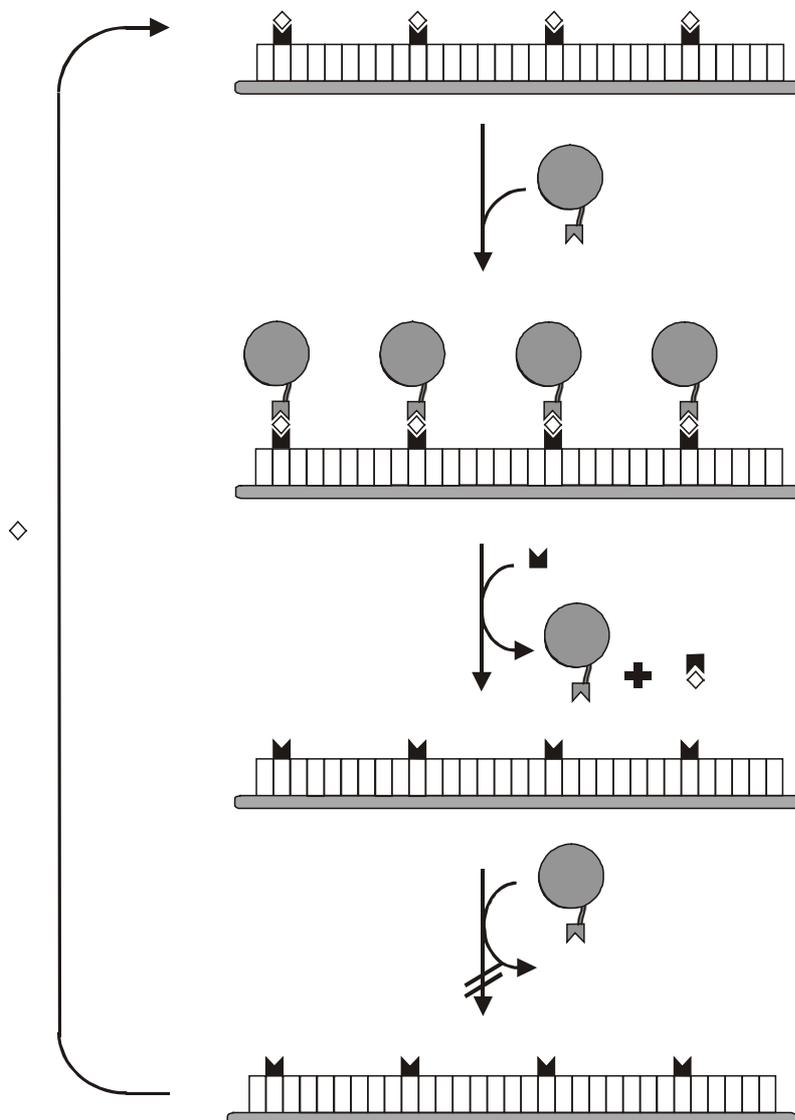


Abb. 2-25: Schematische Darstellung der Deaktivierung / Regeneration der spezifischen Bindung des His-TAG-Proteins an der Immobilisierungsmatrix

Das Experiment zeigt die Schaltbarkeit der spezifischen Proteinbindung an der Oberfläche: EDTA wirkt als chemischer „Aus-Schalter“, Ni^{2+} als chemischer „Ein-Schalter“ (siehe Abb. 2-25).

Es wurden wesentliche Funktionsprinzipien der Metallchelataffinitätschromatographie an der Sensoroberfläche untersucht. Erstmals gelang auf solchen Oberflächen die massenspezifische Detektion von einem Modellprotein, wodurch die prinzipielle Eignung der verwendeten Kombination von Sensortechnik und Oberflächenmodifikation für biochemische Affinitätsstudien demonstriert wurde.

2.5.4 Verdünnte Protein-Oberflächen

Whitesides et al.^[6] beschreiben, dass durch Verdünnung des NTA-terminierten Thiols **12** durch das Oligoethylenoxid-terminierte Thiol **5** an der Oberfläche entsprechend Proteinverdünnte Goldoberflächen zugänglich werden. Dieses Phänomen wurde von ihnen mit Oberflächenplasmonenresonanz beobachtet und soll im folgenden massenspezifisch mittels QCM untersucht werden.

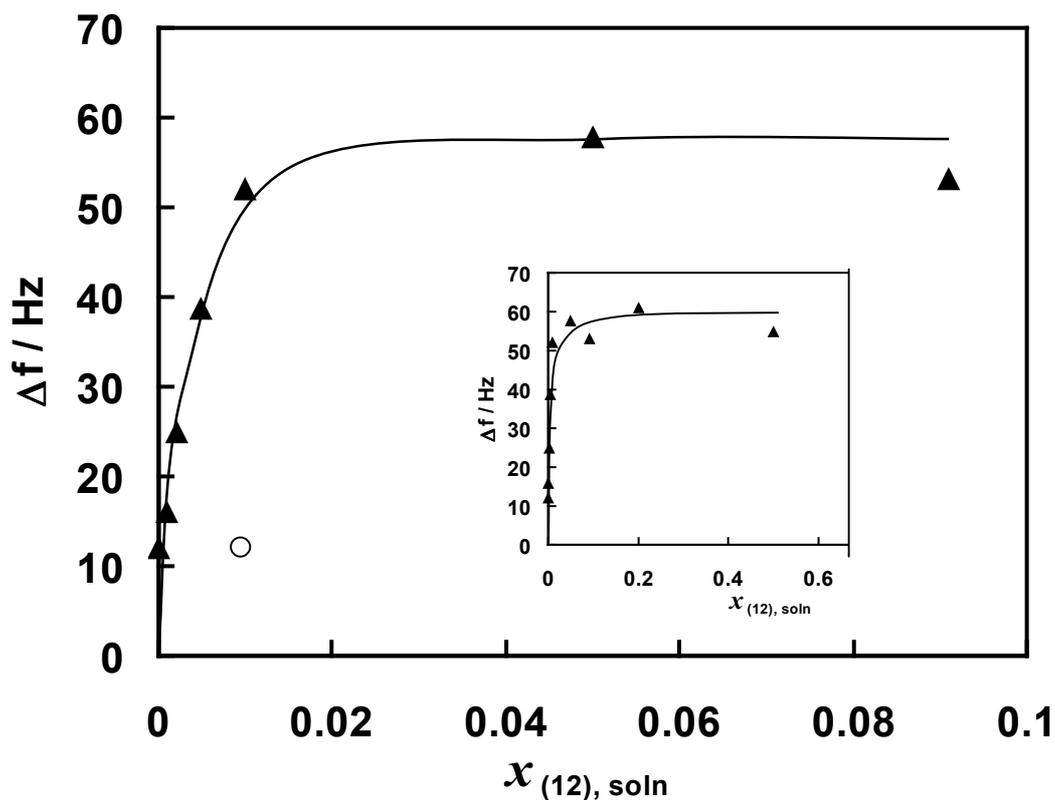


Abb. 2-26: Frequenzabnahmen durch Adsorption von EF₁-ATPase (nach Puffer-Spülen) als Funktion des Molenbruchs von Matrix-Thiol 12 in der Inkubationslösung; Kreis: EF₁-ATPase ohne His-TAG

Abb. 2-26 zeigt die Frequenzabnahmen, die durch Adsorption von EF₁-ATPase und anschließendes Puffer-Spülen als Funktion des Molenbruchs von Thiol 12 in der Inkubationslösung zur vorausgehenden Modifikation der blanken Goldoberfläche beobachtet wurden. Für $x_{(12)} = 0$ ist eine Frequenzabnahme um etwa 11 Hz zu beobachten, diese wird auf unspezifische Adsorption des Proteins zurückgeführt (siehe Kap. 2.5.1). Ebenfalls zeigt sich für EF₁-ATPase ohne His-TAG bei $x_{(12)} = 0.1$ eine geringfügige Frequenzabnahme von 11 Hz (Kreis), die ebenfalls mit unspezifischer Adsorption des Proteins erklärt wird. Mit steigendem

Anteil von Matrix-Thiol **12** nimmt, entsprechend Abb. 2-26, die Frequenzänderung rasch zu und geht bei etwa $x_{(12)} = 0.01$ in Sättigung über.

Gemäß Whitesides et al.^[6] entspricht das Verhältnis von Thiol **12** zu Thiol **5** in der Inkubationslösung im wesentlichen dem Verhältnis der beiden Moleküle in der Monoschicht. Demzufolge wächst mit steigendem Anteil von Thiol **12** in der Inkubationslösung gleichermaßen die Anzahl bzw. die Flächendichte der Bindungsstellen für das His-TAG-Protein an der Oberfläche. Eine laterale Verdünnung kann von Interesse sein, damit die Proteine sich nicht gegenseitig behindern und ihre Funktionstüchtigkeit beibehalten.

Ab einer gewissen Mindest-Flächendichte der His-TAG-Bindungsstellen wird die Sättigungskonzentration durch die geometrische Abmessungen des Proteins (Modell der dichten Kugelpackung) bestimmt. Eine weitere Zunahme des Anteils von Thiol 12 in der Inkubationslösung hat keinen Einfluss auf die Masse des adsorbierenden Proteins.

Abb. 2-27 auf der nächsten Seite veranschaulicht die geschilderten Zusammenhänge.

Geht man von einer statistischen, homogenen Verteilung der beiden Thiole in der Immobilisierungsmatrix aus, so spiegelt der Molenbruch $x_{(12)} = 0.01$ bei Sättigung das Verhältnis der Querschnittsflächen des Protein-Moleküls und des NTA-Thiols wider: 100 nm^2 der Immobilisierungsmatrix sind mit 1 nm^2 des NTA-Thiols bedeckt, dies entspricht in etwa dem molekularen Durchmesser einer Chelatorfunktion. Das Proteinmolekül weist in etwa eine Querschnittsfläche von 100 nm^2 auf. Die verwendete Mutante der EF₁-ATPase verfügt zwar über drei His-TAGs, jedoch ist eine effiziente Bindung schon über eine His-TAG-Funktion denkbar.

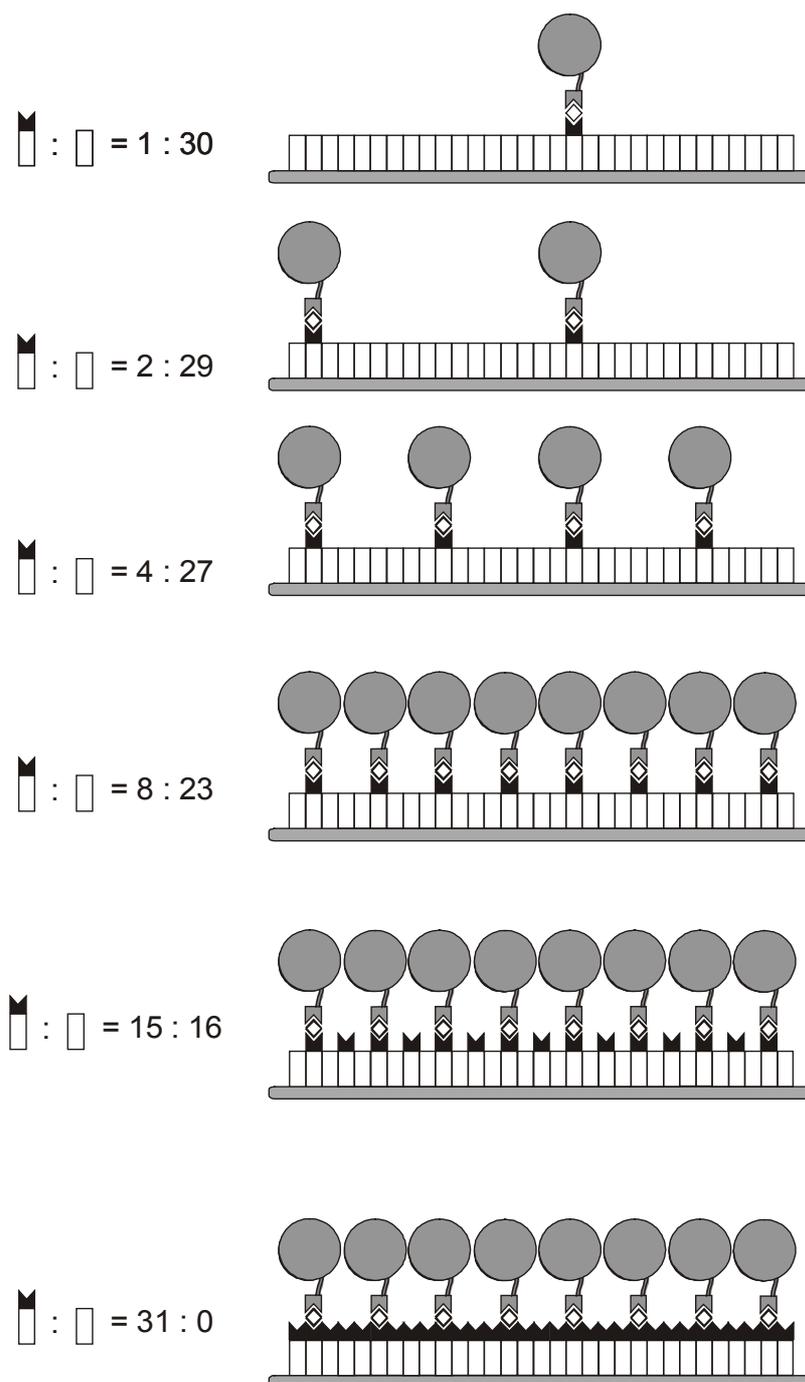


Abb. 2-27: Schematische Darstellung der Oberflächenkonzentrationen von NTA-Thiol, Verdüner-Thiol und His-TAG-Protein

3 Elektronentransfer an Protein-modifizierten Elektroden

Dieses Kapitel beschreibt die elektrochemischen Studien an unspezifisch auf Gold adsorbierten Proteinschichten. Es wurden Untersuchungen mit einer Reihe von Proteinen unterschiedlicher isoelektrischer Punkte, sowie verschiedenen Redoxmarkern durchgeführt. Diese führten zu der generellen Beobachtung, dass an Schichten globulärer Proteine redoxaktive Verbindungen in Lösung elektrochemisch angekuppelt werden können. Man fand ein fundamentales Modell, welches den pH- und Elektrolyt-abhängigen Elektronentransfer durch Proteinschichten mechanistisch erklärt. Damit wurde erstmals das in der Literatur^[17] beschriebene „Ion-Channel-Sensing“ aufgeklärt.

3.1 Einleitung

Modifikationen von Elektrodenoberflächen mit Schichten, wie selbstassemblierte Monoschichten (SAMs), Membranen oder Polymeren, sind von fundamentaler Bedeutung für das Studium von Elektronentransferprozessen an Grenzflächen und für die Entwicklung neuartiger elektrochemischer Sensoren.^[3, 4, 69-71]

Enthalten solche Schichten geladene Gruppen, so haben die resultierenden elektrostatischen Wechselwirkungen mit geladenen Redoxspezies in Lösung einen gravierenden Einfluss auf den Elektronentransfer an den modifizierten Elektroden. Im allgemeinen erlaubt die anziehende Wechselwirkung der Oberfläche und der Redoxspezies den Elektronentransfer, während die abstoßende Wechselwirkung zu einer mitunter vollständigen Blockade desselben führt. Dieses grundlegende Phänomen wurde bereits in den 70er Jahren entdeckt^[72, 73] und von Sugawara et al.^[74] mit der Einführung der sog. Ionenkanal-Sensoren („ion-channel sensors“) erstmals für eine analytische Anwendung genutzt. Die elektrostatische Bindung einer positiv geladenen, elektroinaktiven Spezies an eine negativ geladene Oberfläche führt zu einer Umpolung der Oberfläche und damit zu einer signifikanten Änderung der Redoxantwort einer negativ geladenen Spezies in Lösung. Die Bindung des

Analyten wird auf diese Weise, durch die deutlich höhere Konzentration der Redoxspezies, drastisch verstärkt. Es handelt sich um eine indirekte elektrochemische Detektion einer elektroinaktiven Spezies (Abb. 3-1).

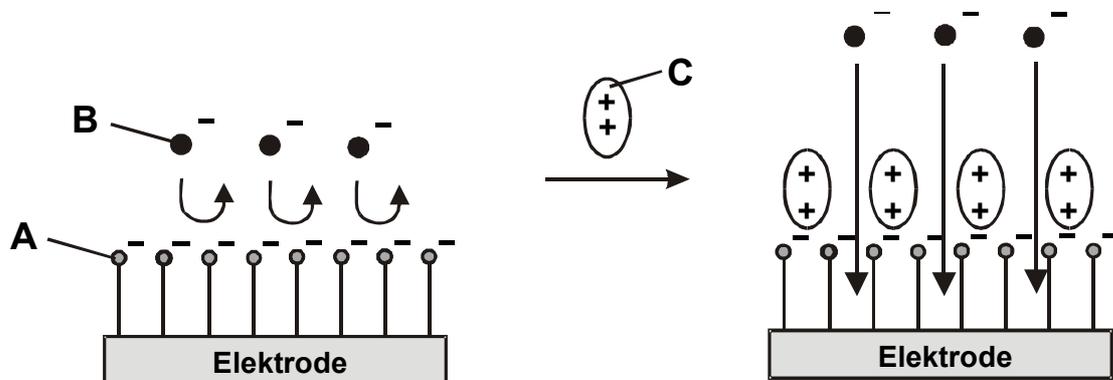


Abb. 3-1: Funktionsprinzip eines sog. „Ionenkanal-Sensors“ (engl. ion-channel sensor) mit sog. „intermolekularen Spalten“ (engl. intermolecular voids) (nach Sugawara)^[74] mit A: Rezeptor, B: Redoxmarker und C: Analyt; Der negativ geladene Rezeptor repulsiert den Redoxmarker. Nach Bindung des elektroinaktiven Analyten, wird die Rezeptorschicht „durchlässig“ für den Redoxmarker. Der Analyt wird somit indirekt nachgewiesen, verstärkt durch die Konzentration des Redoxmarkers.

Zwangsläufig gilt das gleiche Funktionsprinzip für umgekehrte Polaritäten von Analyt, Rezeptor und Redoxmarker.

Die Bindung des Analyten an den Rezeptor kann auch die Blockade des Elektronentransfers auf eine gleichsinnig geladene Redoxspezies in Lösung bewirken. In diesem Fall wird der Analyt indirekt über die Abnahme des Redoxstromes bestimmt.

Seither ist eine grosse Anzahl von Arbeiten auf dem Gebiet der „Ion-Channel-Sensors“ veröffentlicht worden, die auf selbstassemblierenden Monoschichten, Polymeren und Langmuir-Blodgett-Filmen beruhen und für die Detektion von anorganischen Kationen^[75-80], Anionen^[81-83], Polymeren^[84, 85], Proteinen^[86-89] und Antikörpern^[90], DNA-Einzelsträngen^[91], Nukleotiden^[92-94] und weiteren organischen Molekül-Ionen^[95, 96] eingesetzt worden.

Übersichten geben Bühlman et al.^[17], Luo^[97] und Sugawara et al.^[98].

Dünnschichten, welche über protonierbare bzw. deprotonierbare Gruppen verfügen, sind von besonderem Interesse, da die Nettoladung der Schicht pH-abhängig bzw. über den pH einstellbar ist. Dies ermöglicht einen pH-schaltbaren Elektronentransfer.

Verschiedenartigste Dünnschichten wurden in dieser Hinsicht auf Goldelektroden untersucht: selbstassemblierte Monoschichten von Phospholipiden, Mercaptocarbonsäuren und Carboxydisulfiden^[99-101], Aminodisulfiden^[102], Chelatbildnern^[77], Cystein-enthaltenden Di- und Tripeptiden^[103, 104], Dünnschichten von aminoterminierten Dendrimeren^[105, 106], Polyelektrolyt-Multischichten^[107] und Proteinschichten^[86, 87, 108].

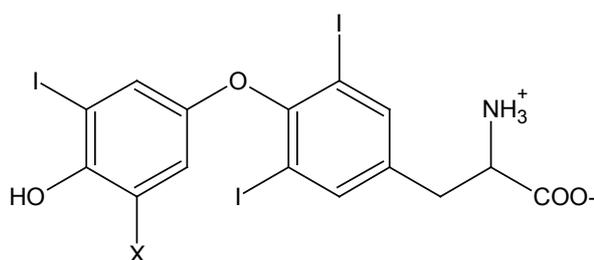
Im Verlauf dieser Arbeit erkannte man, dass Protein-Schichten auf Elektroden das Verhalten von pH- und Elektrolyt-abhängigen Elektronenschleusen aufweisen.

Die im Folgenden angestellten Untersuchungen dienten der mechanistischen Aufklärung dieses Phänomens.

3.1.1 Thyroglobulin als Modellprotein für elektrochemische Studien

Kommerziell erhältliches Thyroglobulin aus der Schweineschilddrüse¹⁶ diente als Modellprotein für die Rahmen von Kapitel 3 durchgeführten elektrochemischen Studien.

Thyroglobulin ist ein in der Schilddrüse reichlich (ca. 75 % des Trockengewichts) enthaltenes hochmolekulares, dimeres Glykoprotein mit einer Molmasse von 660 kD (ca. 10 % Zuckeranteil). Es kann als Trägermolekül für Thyroid-Hormone betrachtet werden. Es enthält die hormonell wirksamen Iodaminosäuren 3,3',5-Triiod-L-thyronin und L-Thyroxin, bereits während ihrer Biosynthese in variablen Anteilen (2-4 pro Dimer) in der Polypeptidkette eingebaut und setzt diese nach enzymatischer Proteolyse frei. Thyroglobulin enthält ca. 90 % des organisch gebundenen Iods.^[109]



X=H Triiodthyronin; X=I Thyroxin

¹⁶ Fluka

3.2 Unspezifische Adsorption von Thyroglobulin auf Gold

Die unspezifische Adsorption von Thyroglobulin auf einer Goldoberfläche wurde mit der eigens entwickelten EQCM-Durchflusszelle untersucht (siehe Exp. Teil).

Simultane Strom- und Frequenzmessungen wurden bei $\text{pH} = 7$ in Gegenwart von Redoxmarkern in 1 mM Konzentrationen durchgeführt: ein Adsorptionsexperiment in Gegenwart von negativ geladenem $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, ein zweites in Gegenwart von positiv geladenem $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$.

Im Falle von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ beaufschlagte man die QCM-Goldelektrode mit einem Potential von $E = + 0.2 \text{ V}$, im Falle von $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ mit einem Potential von $E = - 0.2 \text{ V}$ gegen einen Silberdraht, entsprechend der zugehörigen Redoxpotentiale für die Oxidation des Hexacyanoferrats (II) bzw. für die Reduktion des Hexaminrutheniums (III) an einer blanken Goldelektrode, um im diffusionskontrollierten Potentialbereich zu arbeiten. Man führte die Messungen unter hydrodynamischen Bedingungen, das heisst unter ständigem Durchfluss der Probelösungen durch (ca. 1 Tropfen / Sekunde), um eine konstante Konzentration der Redoxspezies an der Oberfläche zu gewährleisten (siehe Kap. 5.1.1.2 u. 5.1.1.3).

Abb. 3-2 (nächste Seite) zeigt die erhaltenen simultanen Strom- und Frequenzsignal-Verläufe. Zusammengehörige Strom- und Frequenzsignale einer Messung sind mit gleichen Symbolen markiert: Dreiecke kennzeichnen das Adsorptionsexperiment in Gegenwart des Hexacyanoferrats (II), Kreise die Messungen in Gegenwart von Hexaminruthenium (III).

Das Signalrauschen ist auf leichte Schwankungen in der Durchflussrate zurückzuführen.

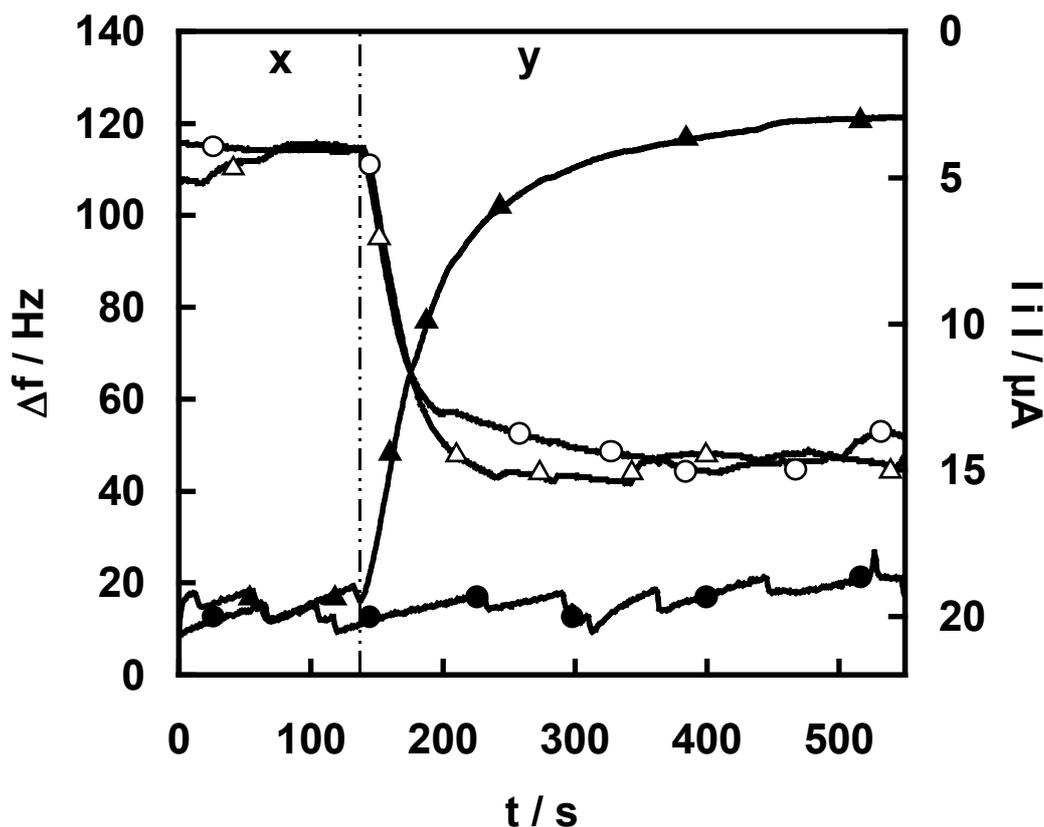


Abb. 3-2: Simultane Frequenz- (weisse Symbole) und Stromsignal-Verläufe (schwarze Symbole, betragsmässig aufgetragen) während der unspezifischen Adsorption von Thyroglobulin auf einer QCM-Goldelektrode ($A = 0.34 \text{ cm}^2$) in Gegenwart eines Redoxmarkers ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (Dreiecke) oder $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ (Kreise)) in der Durchflusszelle; x: 0.1 M KCl + Redoxmarker; y: 0.1 mg / ml Thyroglobulin in 0.1 M KCl + Redoxmarker; (Dreiecke): 1 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$; $E = +0.2 \text{ V vs Ag}$; (Kreise): 1 mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, $E = -0.2 \text{ V vs Ag}$

Nach Beginn des Einströmens der proteinhaltigen Probelösung in die Messzelle (gekennzeichnet durch eine gestrichelte Linie in Abb. 3-2) nahmen beide Frequenzsignale (weisse Symbole) innerhalb von ca. 120 s um etwa 70 Hz ab. Die Übereinstimmung beider Frequenzverläufe lässt darauf schliessen, dass die Adsorption des Proteins von den unterschiedlichen Elektrodenpotentialen und Redoxmarkern unbeeinflusst blieb. Anschließendes Spülen mit 0.1 M KCl hatte keinen Einfluss auf die beiden Frequenzabnahmen (nicht gezeigt in Abb. 3-2), was auf eine irreversible Adsorption des Proteins an der Goldoberfläche hinweist.

Eine weitere QCM-Messung einer Thyroglobulin-Adsorption (hier nicht gezeigt), die man in Abwesenheit der Redoxspezies ohne Potentialbeaufschlagung der Arbeitselektrode durchführte, lieferte ebenfalls eine Frequenzerniedrigung von 70 Hz, obgleich das Protein zudem in erhöhter Konzentration ($\beta = 0.5 \text{ mg / ml}$) in Lösung vorlag. Dieser Wert deutet auf Sättigung des Thyroglobulins auf der Oberfläche in allen Fällen.

Gemäß Sauerbrey^[110] gilt folgender linearer Zusammenhang zwischen der Änderung der arealen Massendichte $\Delta\Gamma_m$ auf der Oberfläche eines Schwingquarzes und der Änderung der Resonanzfrequenz Δf :

$$\Delta\Gamma_m = -c_m \cdot \Delta f \quad (3-1)$$

mit $\Delta\Gamma_m$: Änderung der arealen Massendichte [$\mu\text{g cm}^{-2}$]; Δf : Frequenzänderung [Hz];

c_m : Schichtwäageempfindlichkeit (5 MHz-Resonator) [$17.7 \text{ ng Hz}^{-1} \text{ cm}^{-2}$]

Demzufolge entspricht die Frequenzerniedrigung Δf von 70 Hz einer Zunahme der arealen Massendichte $\Delta\Gamma_m$ von

$$\underline{\Delta\Gamma_m = 1.24 \mu\text{g /cm}^2}.$$

Zur Berechnung eines theoretischen Wertes für die Massendichte $\Delta\Gamma_{m,th}$ der Proteinschicht geht man von einer hexagonal dicht gepackten Monoschicht der Proteinmoleküle aus.

Nimmt man an, das Protein sei ein kugelförmiges Molekül mit gleichmässiger Dichte ($\rho = 1.30 \text{ g cm}^{-3}$), so gilt für den theoretischen Durchmesser d_{th} des Proteinmoleküls^[111]:

$$d_{th} = 2 \cdot 10^7 (3 M / (4\pi \rho N_A))^{1/3} \quad (3-2)$$

mit d_{th} : theoretischer Durchmesser [nm]; M : Molmasse [g mol^{-1}]; ρ : Dichte [1.30 g cm^{-3}].

Für Thyroglobulin mit einer molaren Masse M von $669000 \text{ g mol}^{-1}$ liefert Gleichung (3-2) einen Durchmesser d_{th} von 11.9 nm. Mit Gleichung (3-3) kann die theoretische Massendichte $\Delta\Gamma_{m,th}$ berechnet werden, die sich aus einer hexagonal dichten Kugelpackung der Proteinmoleküle ergibt^[111]:

$$\Delta\Gamma_{m,th} = r_{Au} \cdot 0.9 [10^{14} \cdot 4 \cdot M / (\pi d_{th}^2 N_A)] \quad (3-3)$$

mit Δm_{th} : Masse in [g]; r : Rauigkeit der Goldoberflächen [$r_{Au} = 1.03$] (vgl. Exp. Teil)

So gelangt man zu einer theoretischen Massendichte $\Delta\Gamma_{m,th}$ der Thyroglobulin-Schicht von

$$\underline{\Delta\Gamma_{m,th} = 0.95 \mu\text{g cm}^{-2}}.$$

Die Differenz des gemessenen $\Delta\Gamma_m$ zum theoretischen $\Delta\Gamma_{m,th}$ wird auf die Masse von eingeschlossener Elektrolytlösung in der Proteinschicht zurückgeführt. In Poren oder Rillen der Oberfläche eines modifizierten Quarzresonators zeigt eingeschlossenes Wasser das Verhalten der "gefrorenen Flüssigkeit" und bewirkt einen dementsprechenden Masseneffekt^[112, 113]. Ebenfalls kann hydrodynamisch ankoppelndes Wasser aus angrenzenden Flüssigkeitsschichten eine zusätzliche Abnahme der Frequenz bewirken. Caruso et al.^[114] beobachteten für die unspezifische Adsorption von Ferritin auf Gold in wässriger Lösung etwa doppelt so grosse Frequenzänderungen, als für die getrocknete Proteinschicht¹⁷. Zhang et al.^[115] fanden in dieser Hinsicht etwa 30 % grössere Frequenzänderungen für die Adsorption von Lysozym auf Gold. Eine ausführliche Diskussion dieser Problematik findet sich in einer Arbeit von Höök et al.^[116], die vergleichende Untersuchungen von Proteinadsorptionen auf Titandioxid-Oberflächen mit verschiedenen oberflächensensitiven Techniken anstellten.

Die Abnahme des Oxidationstromes von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ setzt simultan mit der Frequenzerniedrigung ein, verläuft jedoch etwas langsamer (Abb. 3-2, schwarze Dreiecke). Die Stromabnahme hat eine doppelt so große Halbwertszeit wie die korrespondierende Frequenzerniedrigung und erreicht nach ca. 350 s wieder einen neuen konstanten Wert. Der Oxidationstrom des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ist auf etwa 15 % des Ausgangswertes ($t = 0$) reduziert.

Die Verzögerung der Stromabnahme im Vergleich zur Frequenzerniedrigung wird mit dem Einschluss von Wasser in der sich bildenden Proteinschicht erklärt, welches mit der Zeit durch nachfolgend adsorbierende Proteinmoleküle verdrängt wird. Eine sich bildende Proteinschicht kann einen relativ großen Anteil an eingeschlossenem, mitschwingendem Wasser aufweisen, so dass das Frequenzsignal bereits vor vollständiger Bedeckung mit Protein die Masse der gesättigten Schicht „vortäuscht“. Nach und nach wird das in den Lücken eingeschlossene Wasser durch Protein ausgetauscht und die Proteinschicht dicht gepackt. Dies kann zu einer nur geringfügigen Änderung der Nettomasse der Schicht führen, so dass eine Frequenzänderung nicht mehr beobachtet wird. Das Stromsignal hingegen kann diesen Prozess zeitlich auflösen, da die Redoxspezies gewissermassen zwischen proteinbedeckter und wasserbedeckter Goldoberfläche diskriminiert. Weiterhin kann Packung und / oder konformationelle Strukturänderung der Proteinmoleküle *nach* der Adsorption zu weiterer, elektrostatischer Abstoßung und damit zur Abnahme des Stromes führen.

¹⁷ Die Messung der Frequenzänderung des getrockneten Resonators nach Proteinadsorption ist mit der in dieser Arbeit verwendeten, ausschliesslich für *in situ* entwickelten Messzelle, nicht möglich.

Der Reduktionstrom des $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ (Abb. 3-2, schwarze Kreise) wird durch die Adsorption des Proteins in keinsten Weise beeinflusst, auch nicht nach vollständiger Sättigung der Schicht.

Thyroglobulin hat einen isoelektrischen Punkt von 4.5. Demzufolge weist das Protein bei $\text{pH} = 7$ eine negative Nettoladung auf und die Adsorption führt zum Aufbau einer negativ geladenen Schicht auf der Oberfläche. Mit wachsender Oberflächenbedeckung nimmt die elektrostatische Abstossung zum vierfach negativ geladenen $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ in gleichem Maße zu. Die Redoxspezies kann an den bereits bedeckten Stellen die Elektrodenoberfläche nicht mehr erreichen, so dass der Elektronentransfer dort effizient blockiert wird. Hingegen wird $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ durch die Proteinschicht elektrostatisch angezogen und kann weiterhin die Elektrodenoberfläche erreichen, so dass die elektrochemische Reduktion diffusionskontrolliert fort dauert.

Die Beobachtungen zeigen, dass die Proteinschicht als Elektronenschleuse fungiert: bei $\text{pH} = 7$ blockiert die Schicht den Elektronentransfer von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, während der Elektronentransfer auf $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ unvermindert stattfindet.

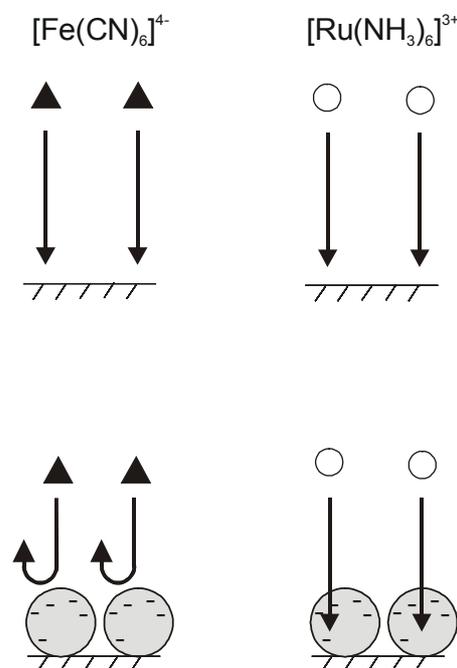


Abb. 3-3: Schematische Darstellung der Adsorption von Thyroglobulin bei $\text{pH} = 7$; Aufbau einer elektrostatischen Barriere für negativ geladenes Hexacyanoferrat (II) (Dreieck), während positiv geladenes Hexaminruthenium(III) (Kreis) auch nach quantitativer Proteinadsorption diffusionskontrolliert reduziert wird.

Geht man davon aus, dass die bedeckte Elektrodenoberfläche die Oxidation des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ vollständig blockiert und die unbedeckte völlig unbeeinflusst ist hinsichtlich des heterogenen Elektronentransfers, so könnte man schlussfolgern, der Oxidationsstrom von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ stelle ein Maß für die Bedeckung der Oberfläche bzw. die noch nicht bedeckte Elektrodenoberfläche dar. Dass dieses Bild aber nicht zulässig ist, haben Stulik et al.^[117] kürzlich anhand von Berechnungen gezeigt. Der diffusionskontrollierte Strom an einem Array von Nanoelektroden ist identisch dem einer Makroelektrode mit der Oberfläche des Arrays.

Weitere Arbeiten, welche sich mit der Detektion einer Protein-Adsorption mittels der Redoxantwort einer Spezies in Lösung beschäftigen, wurden von Moulton und Kuramitz durchgeführt.

Moulton et al.^[108] untersuchten die unspezifische Adsorption von Human Serum Albumin und Immunglobulin G auf Goldelektroden. Die Messungen wurden bei Proteinkonzentrationen von $\beta = 0.1 \text{ mg/ml}$ und $\text{pH} = 7$ durchgeführt, also unter Bedingungen, die mit denen in Abb. 3-2 vergleichbar sind. Sie beobachteten deutliche Abnahmen der CV-Stromantwort von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ auf etwa 10 % des Ausgangswertes innerhalb von 10 min, bewirkt durch die Adsorption der Proteine. Sowohl das Elektrodenpotential, als auch der pH-Wert hatten Einfluss auf den Verlauf der Adsorption und die Masse adsorbierten Proteins bei Sättigung.

Kuramitz et al.^[86, 87] beobachteten einen verstärkten Elektronentransfer auf $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ an einer Biotin-SAM-modifizierten Goldelektrode nach spezifischer Bindung von positiv geladenem Avidin.

Die Messung einer Proteinadsorption mittels QCM und gleichzeitigem Erfassen des Stromsignals eines Redoxmarkers in Lösung unter hydrodynamischen Bedingungen sind nach unserem besten Wissen hier zum ersten Mal vorgestellt.

3.2.1 AFM-Aufnahme einer Thyroglobulin-modifizierten Goldoberfläche

Es wurden AFM-Aufnahmen an blanken und Thyroglobulin-modifizierten AFM-Goldsubstraten im Contact-Mode und Non-Contact-Mode an Luft durchgeführt.¹⁸ Hierzu wurden frisch gereinigte, blanke AFM-Goldsubstrate zunächst getempert, durch kurzzeitige Exposition (ca. 5 s) in eine reduzierende Wasserstoff-Flamme. Dadurch bilden sich sehr glatte Goldoberflächen aus. Dies zeigt Abb. 3-4 (nächste Seite). Es sind charakteristische, atomare Stufen von Au(111)-Ebenen erkennbar.

Die Modifikation mit Thyroglobulin (gemäss Kap. 5.2) erfolgte nach Tempern. Nach Spülen und Trocknen an Luft erhielt man die in Abb. 3-5 (nächste Seite) gezeigte AFM-Aufnahme.

Die charakteristischen, atomaren Stufen einer *blanken*, getemperten Goldoberfläche, gemäss Abb. 3-4, sind *nicht* zu beobachten. Offensichtlich ist das Goldsubstrat an der untersuchten Stelle vollständig mit dem Protein bedeckt. Die kleinsten aufgelösten Strukturen weisen Durchmesser von etwa 10-15 nm auf und werden einzelnen Protein-Molekülen zugeordnet. So findet sich eine gute Übereinstimmung zum berechneten theoretischen Durchmesser d_{th} von 11.9 nm. Bei den grösseren erkennbaren Strukturen handelt es sich vermutlich um Protein-Agglomerate (Cluster). Im Gegensatz zu der vorher getroffenen Annahme einer hexagonal dichten Packung kugelförmiger Proteinmoleküle weist die mittels AFM aufgelöste Struktur eine unregelmässige Packung der Proteinmoleküle auf. Weiterhin kann stellenweise die Ausbildung einer zweiten Proteinschicht auf der unterliegenden erkannt werden.

¹⁸ durchgeführt von Martin Görlich, Fachbereich Physik der Universität Osnabrück

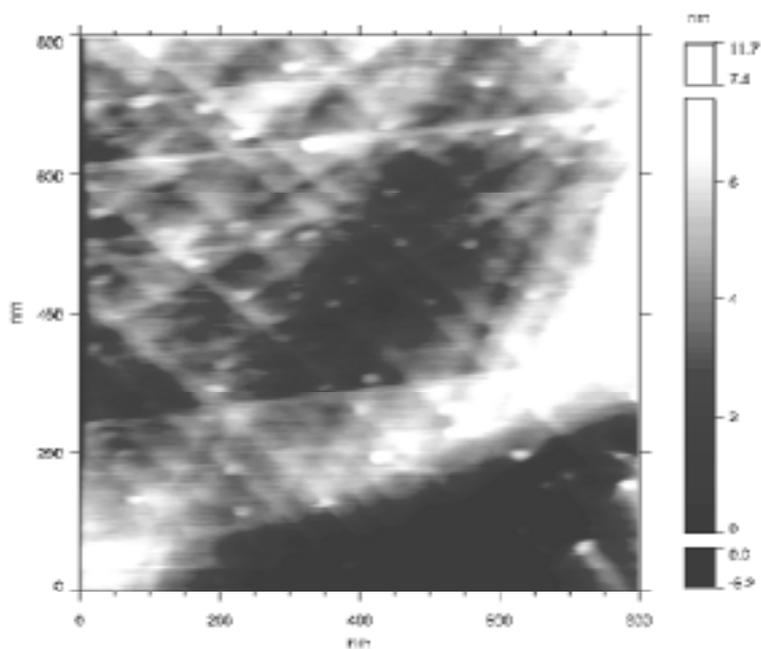


Abb. 3-4: AFM-Aufnahme einer getemperten Goldoberfläche ($R_{Au} = 1.0045$)

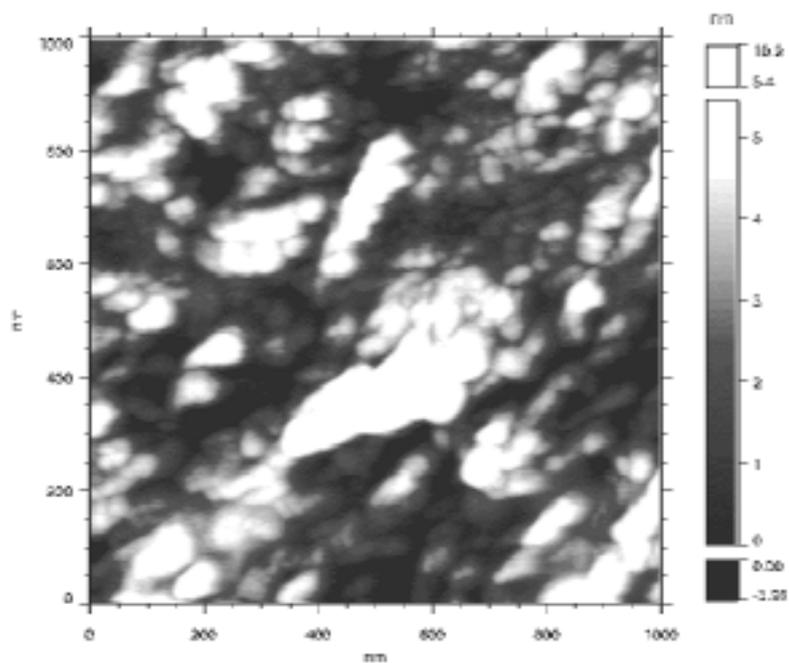


Abb. 3-5: AFM-Aufnahme einer Thyroglobulin-modifizierten Goldoberfläche

3.3 Elektronenschleusenfunktion Protein-modifizierter Goldelektroden

3.3.1 Redoxindikation der pH-Titration von Proteinschichten

Die pH-Abhängigkeiten der Redoxströme verschiedener Redoxmarker – negativ geladenem $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, positiv geladenem $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ und neutralem Ferrocenylethanol – wurden an Thyroglobulin-modifizierten Gold-Scheibenelektroden (gemäß Kap. 5.2).

Aus Gründen der besseren Auswertung der Voltammogramme wurden die Messungen mit differentieller Pulsvoltammetrie^[118, 119] durchgeführt. Man erhielt die in Abb. 3-6 gezeigten pH-Abhängigkeiten der Redoxströme.

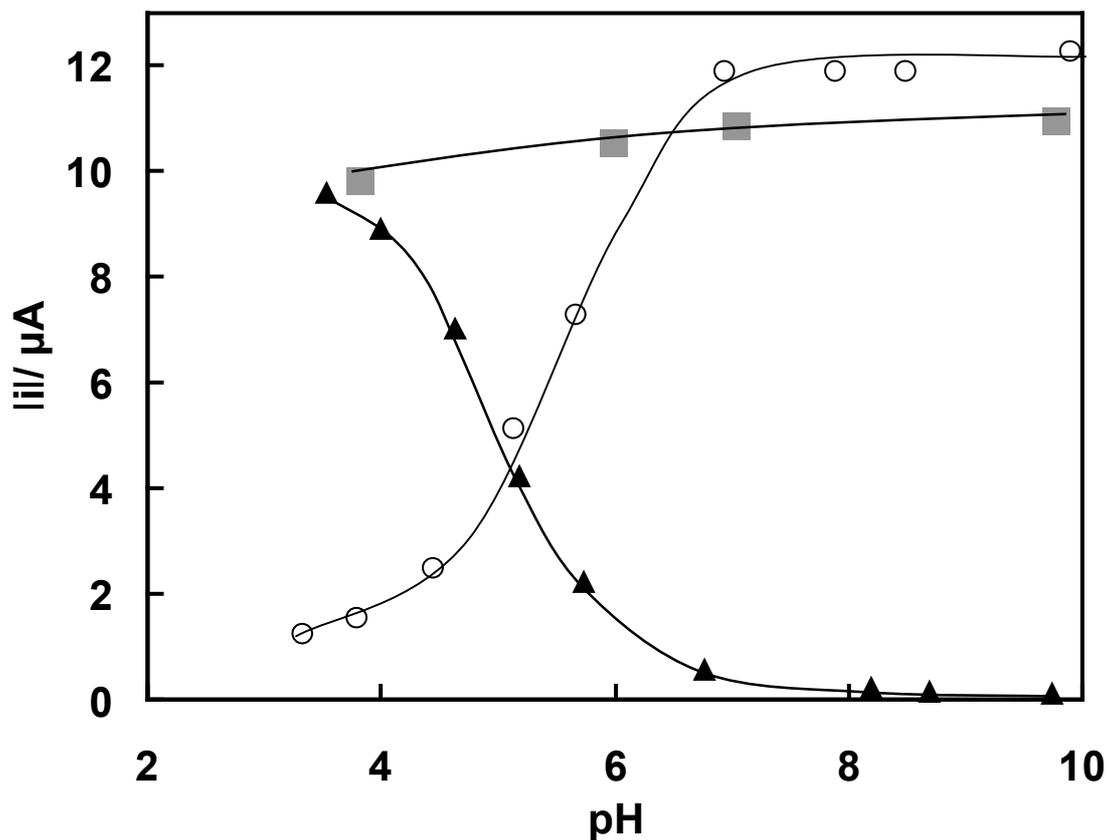


Abb. 3-6: pH-Abhängigkeiten der differentiellen Pulsstrombeträge an einer Thyroglobulin-modifizierten Gold-Scheibenelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$) in 0.1 M KCl; Dreieck: 1 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$; Kreis: 1 mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$; Quadrat: 1 mM Ferrocenylethanol; der pH-Wert wurde durch Zufügen von verdünnter HCl- bzw. KOH-Lösung eingestellt; $v = 5 \text{ mV/s}$, Amplitude: 25 mV

Bei grossen pH-Werten beobachtet man sehr kleine Ströme für $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, die nur etwa ein Prozent der Ströme bei $\text{pH} < 4$ betragen. Der Elektronentransfer ist effizient blockiert. In Richtung des sinkenden pH-Wertes kommt es bei $\text{pH} = 6.5$ zum Einsetzen des Stromanstiegs, welcher dann innerhalb von 2.5 pH-Einheiten sigmoidal auf maximale Werte ansteigt. Die maximalen Ströme, die für $\text{pH} < 4$ beobachtet werden, sind identisch mit Strömen, die unter gleichen Bedingungen an blanken Goldelektroden gemessen werden. Bei $\text{pH} = 5$ hat die Titrationskurve einen Wendepunkt, dort hat der Strom einen halbmaximalen Wert. Der Halbwertstrom $i/2$ wird definiert als die Hälfte der Differenz aus dem gemessenen maximalen Strom I_{max} und dem minimalen Strom I_{min} im gesamten untersuchten pH-Intervall, entsprechend Gleichung (3-4):

$$i/2 = \Delta I / 2 = (I_{\text{max}} - I_{\text{min}}) / 2 \quad (3-4).$$

Der dem Halbwertstrom $i/2$ zugehörige pH-Wert wird fortan als $\text{pH}_{i/2}$ bezeichnet.

Das Titrationsexperiment wurde in gleicher Weise mit $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ durchgeführt.

Maximale Reduktionsströme sind bei hohen pH-Werten zu beobachten, die vergleichbar mit Strömen an blanken Goldelektroden sind. Mit schrittweiser pH-Erniedrigung setzt bei $\text{pH} = 7$ die Stromabnahme ein, welche sich über 3 pH-Einheiten weiter fortsetzt und ebenfalls den typischen Verlauf einer Titrationskurve aufweist. Bei $\text{pH} = 5.6$ hat die Kurve einen Wendepunkt und der Reduktionsstrom einen halbmaximalen Wert. Es zeigt sich, zumindest bis zur unteren Grenze des untersuchten pH-Intervalls, keine vollständige Blockierung des Elektronentransfers, wie sie für $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ im Alkalischen beobachtet wird.

Die Oxidationsströme des ungeladenen Ferrocenylethanol weisen keine vergleichbaren pH-Abhängigkeiten auf und sind mehr oder weniger über den gesamten pH-Bereich konstant. Eine leichte Abnahme des Stromsignals um etwa 10 % des Maximalwerts, kann in Richtung des sauren pH-Bereichs beobachtet werden.

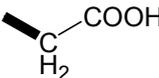
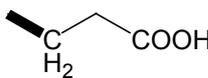
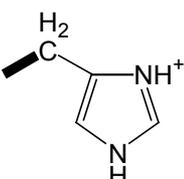
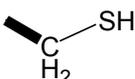
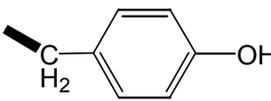
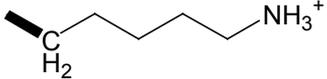
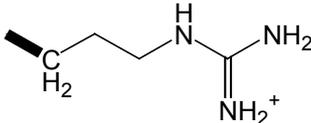
Die eingesetzten Redoxmarker zeigen an *blanken* Elektroden innerhalb des untersuchten pH-Intervalls, pH-unabhängige differentielle Pulsstrombeiträge (siehe Kap. 5.6.2).

Die Proteinschicht zeigt die Funktion einer pH-abhängigen Elektronenschleuse, sowohl für die positiv als auch die negativ geladene Redoxspezies, während die ungeladene unbeeinflusst

bleibt. Das Elektronenschleusen-Verhalten erklärt sich durch die ampholytische Natur des Proteins, welches basische und saure funktionelle Gruppen (siehe Tab. 3-1). in den Seitenketten und den beiden Termini trägt und durch den isoelektrischen Punkt des Proteins quantifiziert ist.

Die beobachteten Stromantworten können wie folgt vereinfacht erklärt werden: bei $\text{pH} > \text{pI}$ weist das Protein eine negative Nettoladung auf, so dass die anionische Redoxspezies abgestoßen wird, die kationische hingegen passieren kann. Mit sinkendem pH-Wert verliert das Protein negative Ladung. Demzufolge vermindert sich die Repulsion des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, der Oxidationsstrom nimmt zu.

Tab. 3-1: Ionisierbare Aminosäure-Seitenketten mit zugehörigen pKs-Werten

			
Asparaginsäure	Glutaminsäure	Histidin	Cystein
3.9	4.07	6.04	8.33
			
Tyrosin	Lysin	Arginin	
10.13	10.79	12.48	

Gleichzeitig verringert sich die Attraktion des $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, der Reduktionsstrom nimmt ab. Bei $\text{pH} < \text{pI}$ bewirkt die positive Nettoladung der Proteinschicht die Repulsion des $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ und damit die weitere Abnahme des Reduktionsstromes, während $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ angezogen wird und dessen Oxidation diffusionskontrolliert fort dauert.

Nach dieser vereinfachten Vorstellung würde die Stromantwort der geladenen Redoxspezies durch die *Nettoladung* des Proteins gesteuert. Ungeladenes Ferrocenylethanol erfährt über den

gesamten pH-Bereich keine elektrostatische Abstoßung und zeigt daher stets Oxidationsströme wie an blanken Elektroden (Abb. 3-7).

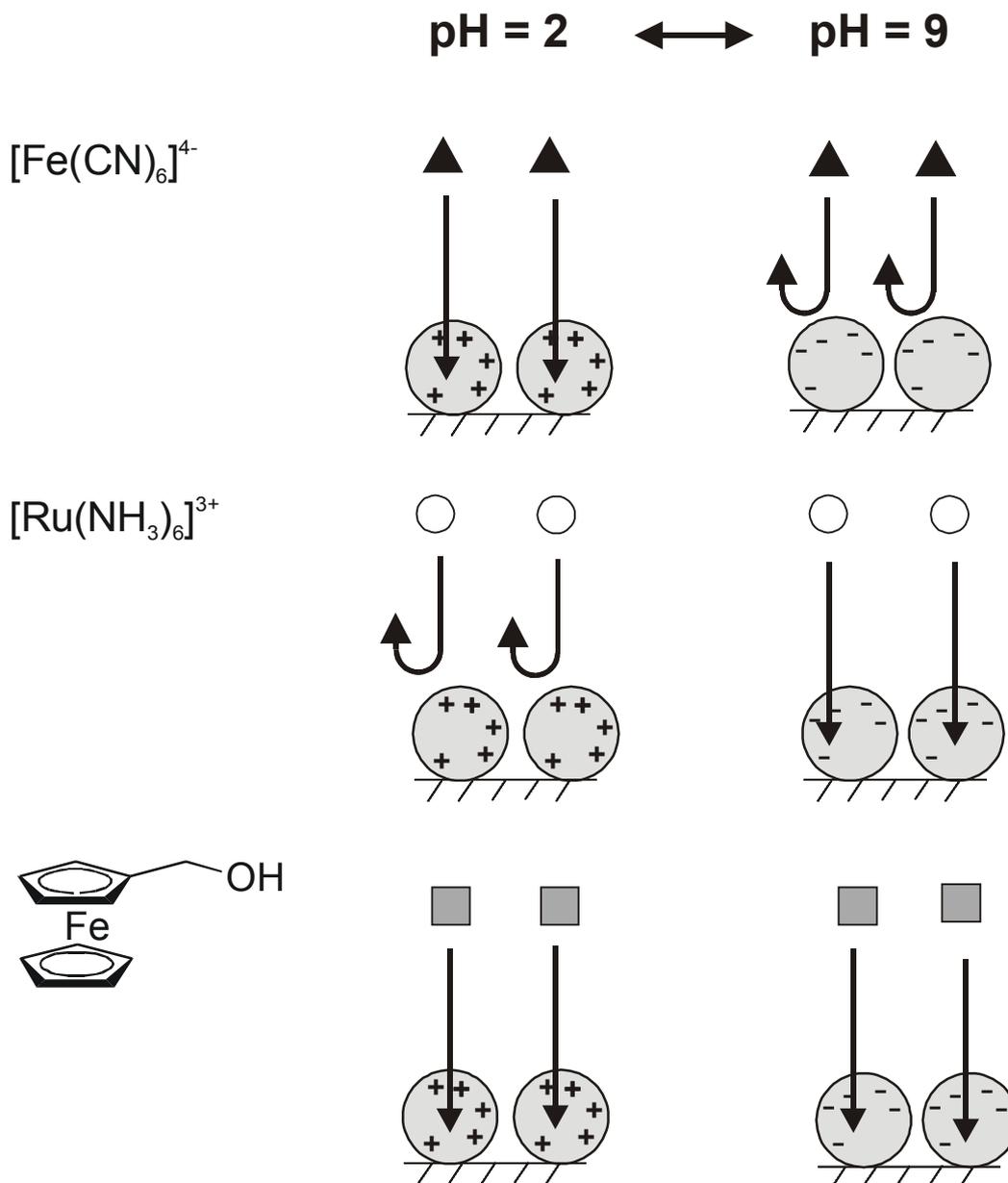


Abb. 3-7: Schematische Darstellung der Elektronenschleusenfunktion einer Thyroglobulinschicht:

Bei pH = 2 zeigt $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ maximale Ströme und wird bei pH = 9 repulsiert, $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ wird bei pH = 2 repulsiert und zeigt bei pH = 9 maximale Ströme, Ferrocenylethanol zeigt über den gesamten pH-Bereich maximale Ströme.

In der Literatur finden sich Beispiele von molekularen Schichten, welche die Funktion von pH-abhängigen Elektronenschleusen zeigen.

Nakashima et al.^[120] haben Monoschichten von Bis-(ω)-mercaptoundecylphosphat mit Phosphatgruppen hinsichtlich ihrer Funktion als Elektronenschleuse für negativ geladenes $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ untersucht: der Elektronentransfer der Oxidation des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ wird bei $\text{pH} > 4$ vollständig blockiert.

Cheng und Brajter-Toth^[99, 100] machten vergleichbare Beobachtungen an SAMs von Liponsäure auf Goldelektroden: der Elektronentransfer auf $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ in Lösung wird bei hohem pH-Wert, d.h. negativ geladener Schicht, vollständig unterdrückt.

Wang und Kaifer^[99-101] untersuchten ebenfalls SAMs von Liponsäure hinsichtlich der Eigenschaft als Elektronenschleuse für $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. Die Darstellung des kathodischen Stromes als Funktion des pH-Wertes bei konstantem Potential der Elektrode, lieferte sigmoidale Titrationskurven, aus deren Wendepunkt ein pKs-Wert von etwa 6 ermittelt wurde.

In einer Reihe von Veröffentlichungen berichten Takehara et al.^[103, 104] von SAMs von Glutathion - ein Cystein-enthaltendes Tripeptid – und weiteren SAMs Cystein-enthaltender Dipeptide auf Goldelektroden. Sie beobachteten eine signifikante pH-Abhängigkeit der Elektronenschleusen-Funktion für $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$.

Liu et al.^[105] berichten von Polymer-Komposit-Filmen, die auf goldbedampften Siliziumwafern verankert wurden. Diese Komposit-Membrane waren aus aminoterminierten Dendrimern aufgebaut, welche durch eine Polymerschicht miteinander vernetzt wurden. Sie zeigten eine vollständig reversible, pH-schaltbare Permeabilität, sowohl für kationische, als auch anionische redoxaktive Spezies in Lösung. Die pH-abhängigen Änderungen der Ladungen der Aminogruppen des Dendrimers und der Carboxylgruppen des Polymers bewirkten die Funktionalisierung mit zwei voneinander unabhängigen Ionenschleusen, die von Kationen nur bei alkalischem und von Anionen nur bei saurem pH passiert werden konnten. Ein neutraler pH-Wert bewirkte eine gleichartige, mittlere Durchlässigkeit für beide Ionen.

Zhao et al.^[106] untersuchen SAMs amino-terminierter Dendrimere, welche in eine Monoschicht eines Alkanthiols eingebettet waren. Die Dendrimere fungierten als Ionenschleusen, die kationische Redoxspezies nur bei alkalischen pH-Werten durchließen, während die Durchlässigkeit für Anionen pH-unabhängig war.

Kuramatiz et al.^[86, 87] berichten von einer Proteinschicht, die als Elektronenschleuse fungierte. Die Einführung einer Avidinschicht auf einem Biotin-SAM bewirkte eine signifikante Änderung des Elektronentransfers von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ und zeigte eine starke pH-

Abhängigkeit der Elektronenschleusen-Funktion gegenüber der Redoxspezies. Bei pH-Werten, die größer waren als der isoelektrische Punkt des Proteins, war die Durchlässigkeit für $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ aufgrund der elektrostatischen Abstoßung zu der negativ geladenen Avidinschicht stark reduziert. Bei Verwendung von NutraAvidin - einem deglykosylierten Avidin mit einem isoelektrischen Punkt von 6.3 anstelle von Avidin mit einem isoelektrischen Punkt von 10.5 zeigte sich, dass die Permeabilität der Redoxspezies durch die Proteinladung bestimmt wurde.

3.3.2 Vergleichende Untersuchung verschiedener Proteine

Die pH-Abhängigkeiten der Redoxströme von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ und $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ wurden an Schichten weiterer 15 Proteine mit verschiedenen isoelektrischen Punkten untersucht.

In Tab. 3-2 sind die erhaltenen Resultate zusammengestellt.

Tabelle 3-2: Übersicht der untersuchten Proteine mit Messwerten aus den Titrationskurven

Protein	Masse/ kD ^a	pI ^b	pH _{i/2} ^c		ΔpH ^e		ΔpH ^f		I _{max} ^g		I _{min} ^h		I _{max} ⁱ		I _{min} ^j	
			A	B	A	B	A	B	A	A	B	B				
Cytochrom C	12.4	9.3	6	3***	3	2.3	13.44	0.73	12.26	3.64						
Myoglobin	17.2	7.15	4.8 !	---	3.0	---	8.0	0	10.05	---						
Trypsin	23.8	10.5	5.0***	0	3	---	10.25	0.83	10.45	---						
Avidin^l		10.5	5.8		3		10.4	0.84								
Amyloglucosidase	97	3.5	4.3	---	4	---	7.9	0.36	10.1	---						
Concanavalin A	104	5	5.1	3.3	2	2	9.56	0	9.83	1.38						
Alkohol-			5.4	5.2	2	3	16.66 ^p	0.67	7.37	2.54						
Dehydrogenase																
Aldolase	161	6.1	4.8 !!!	4.2	2	3	10.67	0	8.8	1.04						
Glucoseoxidase	186	4.2	6.5***	3.3	5	2.5	13.77	2.65	12.46	5.93						
Catalase^m	240	5.4	5.1	4	2	3	13.32	0	12.06	0.97						
EF₁-ATPase	360	5	5.4	4.2	2	4	10	1	12	1						
Catalaseⁿ	385		5.5													
Urease^q	480	0	---	---	---	---	11	---	---	---						
Thyroglobulin^k	660	4.5	4.6 !!!	3.4	2.5	2	9.1	0.1	10.7	1.44						
Thyroglobulin^l	660	4.5	5	5.3	3.2	3.5	9.58	0.2	10.56	3.33						
Ferritin	900		5.1 !!!	0	3		11.15	0.1	10.68							
β-Glucoronidase			5	0	3		10.06	0	10.74							

Die Messungen wurden mit je 1 mM Redoxspezies (A: Fe(CN)₆⁴⁻; B: Ru(NH₃)₆³⁺) in x ml 0.1 M Na₂HPO₄ + y ml 0.1 M Citronensäure durchgeführt (durch entsprechendes Volumen-Verhältnis auf pH-Wert eingestellt), ausser *l*: gemessen in 0.1 M KCl, pH-Wert eingestellt mit verd. KOH- bzw. verd. HCl-Lösung

a: Molekulare Masse [kD] und *b*: isoelektrischer Punkt gemäss Literatur [111, 137]; *c*: pH-Wert bei halbmaximalem Strom für A: Fe(CN)₆⁴⁻; *d*: pH-Wert bei halbmaximalem Strom für B: Ru(NH₃)₆³⁺; *e*: pH-Intervall, über das sich die Stromkurve für Fe(CN)₆⁴⁻ erstreckt; *f*: pH-Intervall, über das sich die Stromkurve für Ru(NH₃)₆³⁺ erstreckt; *g*: maximaler gemessener Strom für Fe(CN)₆⁴⁻; *h*: minimaler gemessener Strom für Fe(CN)₆⁴⁻; *i*: maximaler gemessener Strom für Ru(NH₃)₆³⁺; *j*: minimaler gemessener Strom für Ru(NH₃)₆³⁺; *k*: in Citronensäure-Phosphatpuffer gemessen; *l*: ohne Puffer; *m*: aus Rinderleber; *n*: aus Spargel; *p*: auffällig grosser Wert; *q*: einziges Protein, welches keine Strom-pH-Kurve für Fe(CN)₆⁴⁻ liefert, sondern einen konstanten maximalen Wert, möglicherweise nicht adsorbiert; „!!!“: sehr gut ausgebildete Titrationskurve; „***“ = eher mässig ausgebildete Titrationskurve; „leere Zelle“: Messung nicht durchgeführt;

Die Ergebnisse der angestellten Untersuchungen sind durch 1.) die $\text{pH}_{i/2}$ -Werte bei halbmaximalen Strömen, die jeweils für $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ und $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ an den verschiedenen Proteinschichten ermittelt wurden, 2.) die maximalen und minimalen Ströme (I_{max} , I_{min}) und 3.) den pH-Bereich für die Veränderung $I_{\text{max}} \rightarrow I_{\text{min}}$ charakterisiert.

Die $\text{pH}_{i/2}$ -Werte für die Halbwertsströme von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ streuen bei sämtlichen Proteinen relativ eng um einen Mittelwert von 5.2, d.h. die den Halbwertsströmen zugehörigen $\text{pH}_{i/2}$ korrelieren nicht mit den isoelektrischen Punkten der Proteine. Mitunter treten Abweichungen von mehr als 5 pH-Einheiten zwischen $\text{pH}_{i/2}$ und dem isoelektrischen Punkt eines Proteins auf.

Im Falle des $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ zeigt sich bei einer geringen Zahl der untersuchten Proteine keine pH-abhängige Stromantwort, die Ströme sind im gesamten untersuchten pH-Intervall konstant maximal.

3.3.3 pH-Schaltung des Elektronentransfers an Proteinschichten

Im Hinblick auf die Untersuchung einer schnellen, pH-induzierten Schaltung einer Protein-modifizierten Goldelektrode, führte man Messungen an einer rotierenden Gold-Scheibenelektrode durch. Zusätzlich wurde die Messlösung mit einem Magnetrührer gerührt, so dass sich der pH-Wert durch Zugabe von einem Tropfen 1 M HCl bzw. 1 M KOH-Lösung sofort ($t < 1$ s) auf Werte zwischen 2-3 bzw. 9-10 einstellte.

Abb. 3-8 zeigt den Oxidationsstrom von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ während einiger Schaltzyklen an der Thyroglobulin-modifizierten rotierenden Scheibenelektrode als Funktion der Zeit.

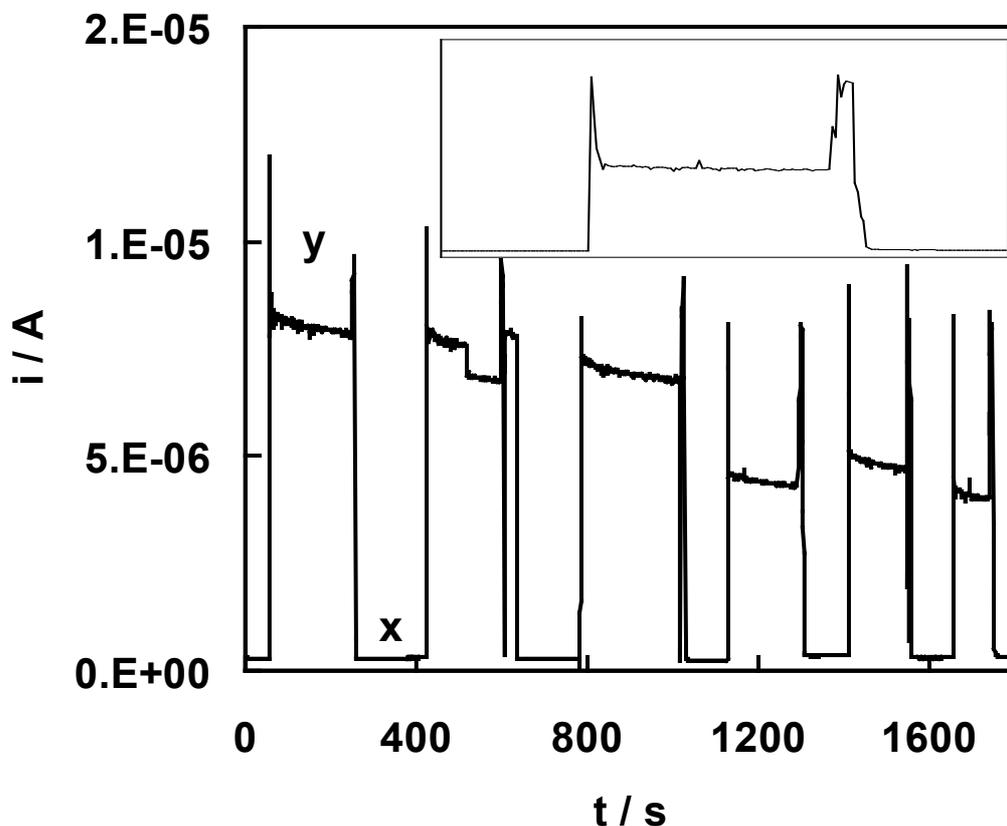


Abb. 3-8: pH-Abhängigkeit des Oxidationsstromes von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ an einer Thyroglobulin-modifizierten rotierenden Gold-Scheibenelektrode ($A = 0.07\text{cm}^2$); RPM = $1640\text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$; $E = +0.2\text{ V}$ vs Ag/AgCl (KCl, ges.); $1\text{ mM Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ in 0.1 M KCl bei x: pH= 9-10 und y: pH= 2-3; pH-Wert eingestellt durch tropfenweise Zugabe von 1 M HCl bzw. 1 M KOH ; Inset: Vergrößerung des letzten Schaltzyklus in x-Richtung

Die Strom-Zeit-Kurve in Abb. 3-8 zeigt eine schnelle Antwort der Thyroglobulin-modifizierten Elektrode auf sprunghafte pH-Änderungen in der Messlösung. Bei alkalischen pH-Werten sind die Ströme minimal. Wird der pH-Wert abrupt von basisch nach sauer gestellt, erfolgt ein sprunghafter Anstieg auf einen Maximalstrom und unmittelbarer Abfall auf einen kleineren Wert, der mit der Zeit langsam abklingt. Rückstellen des pH-Werts ins Alkalische bewirkt zunächst einen unerwarteten Anstieg auf den Maximalstrom, dann erfolgt rascher Abfall auf den Minimalwert. Der Minimalwert erweist sich als reproduzierbar, hingegen werden die Ströme bei sauren pH-Werten von Schaltzyklus zu Schaltzyklus kleiner, ein Hinweis auf irreversible Prozesse in der Schicht, wie z.B. Denaturierung des Proteins.

Das Experiment zeigt die pH-Schaltbarkeit der Elektronenschleusenfunktion der Thyroglobulinschicht für $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ in Lösung.

Bei alkalischen pH-Werten stellt die negativ geladene Proteinschicht eine elektrostatische Barriere für das $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ dar. Durch Austausch mit der sauren Probelösung erfolgt, einhergehend mit der Durchmischung, die Umpolung der Proteinschicht. Es resultiert eine positive Nettoladung, die zur Anziehung des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ führt. Dies bewirkt einen drastischen Anstieg des Oxidationsstromes. Rückstellen des pH-Werts ins Alkalische führt wieder zu negativer Nettoladung der Proteinschicht und verursacht eine Expulsion der zuvor angereicherten Redoxspezies. Durch Deprotonierung der Proteinmoleküle erhält die Schicht wieder eine negative Nettoladung und damit ihre Barrierefunktion gegenüber der negativ geladenen Redoxspezies. Demzufolge kehrt der Strom wieder auf den Ausgangswert zurück. Offensichtlich werden bei pH-Schalten zusätzliche Ladungsträger aktiviert. Dies erklärt die Stromspikes und den unerwarteten Stromanstieg bei Stellen des pH-Werts von sauer nach alkalisch.

3.4 Elektrostatische Akkumulation der Redoxspezies an der Proteinschicht

3.4.1 Akkumulation von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$

Bei kleinen Konzentrationen weist der $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Oxidationsstrom (CV) an einer Thyroglobulin-modifizierten Goldelektrode eine lineare Abhängigkeit von der Konzentration der Redoxspezies auf, gemäß Abb. 3-9. Extrapolation liefert einen positiven Y-Achsenabschnitt von $0.6 \mu\text{A}$. Dies deutet auf eine Oberflächenakkumulation der Redoxspezies hin, die schon bei sehr kleinen Konzentrationen im unteren mikromolaren Bereich festzustellen ist, denn ein „normaler“ diffusionskontrollierter Strom i_d ist für $c_{\text{ox}}=0$ ebenfalls null.

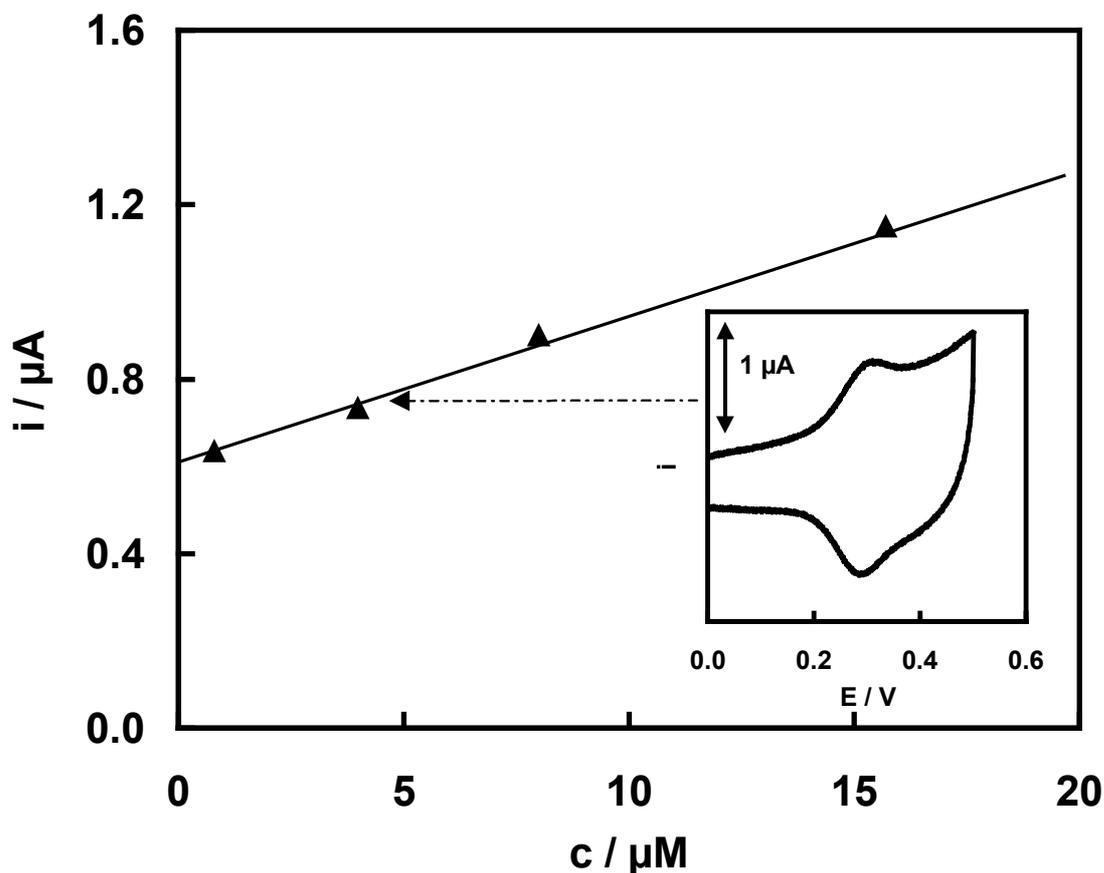


Abb. 3-9: Konzentrationsabhängigkeit des CV-Oxidationsstroms von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ an einer Thyroglobulin-modifizierten Goldelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$) in 0.1 M Citronensäure-Lösung; $\text{pH} = 2.5$; Einschub: zum markierten Punkt zugehöriges cyclisches Voltammogramm ($c = 4.0 \mu\text{M}$); $v = 0.1 \text{ V/s}$

Das eingefügte Cyclovoltammogramm in Abb. 3-9 weist eine geringe Peakseparation auf, ein Charakteristikum für eine oberflächenfixierte Redoxspezies.^[69] Zudem ist an einer *blanken* Goldelektrode in diesem Konzentrationsbereich kein Signal zu beobachten. Integration der anodischen Welle liefert eine Ladung, die einer Oberflächenkonzentration von $20 \cdot 10^{-12} \text{ mol / cm}^2$ entspricht, unter Annahme einer Ein-Elektronen-Oxidation der akkumulierten Redoxspezies.

Der Oxidationsstrom ist bei einer Lösungskonzentration von $10.6 \text{ } \mu\text{M}$ linear von der Vorschubgeschwindigkeit abhängig, was ebenfalls auf eine an der Oberfläche absorbierende Redoxspezies hindeutet (Abb. 3-10).

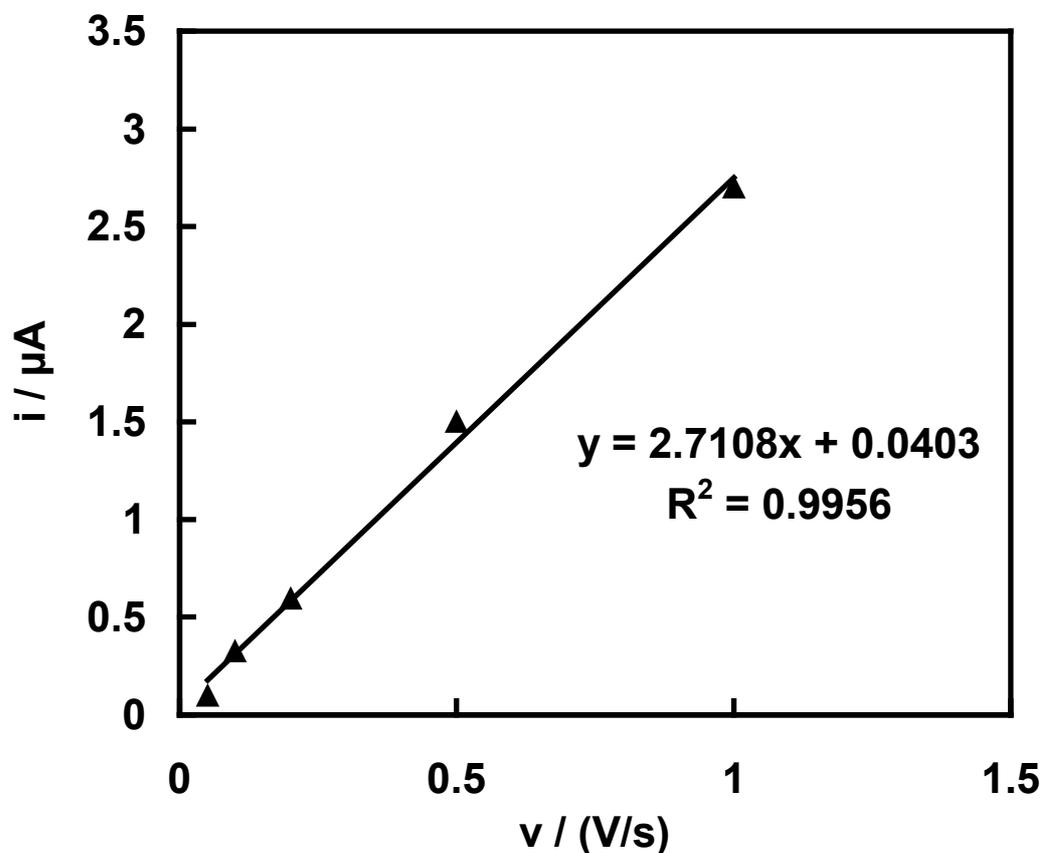


Abb. 3-10: Abhängigkeit des CV-Peakstroms der Hexacyanoferrat-Oxidation von der Vorschubgeschwindigkeit an einer Thyroglobulin-modifizierten Gold-Scheibenelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$); $c(\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}) = 10.6 \text{ } \mu\text{M}$ in 10 mM KCl ; $\text{pH} = 2.85$, eingestellt mit verdünnter HCl-Lösung

Mit steigender Konzentration der Redoxspezies erfolgt die Zunahme der cyclovoltametrischen Peakseparation des Fe(II) / Fe(III)-Redoxpaares (Abb. 3-11, nächste Seite). Bei kleinsten Konzentrationen sind geringfügige Peakseparationen von 10 mV zu beobachten. Mit zunehmender Konzentration ist im Bereich $c \leq 75 \text{ } \mu\text{M}$ ein gleichmässiges Anwachsen der Peakseparation festzustellen, bei $c = 1 \text{ mM}$ beträgt diese 70 mV .

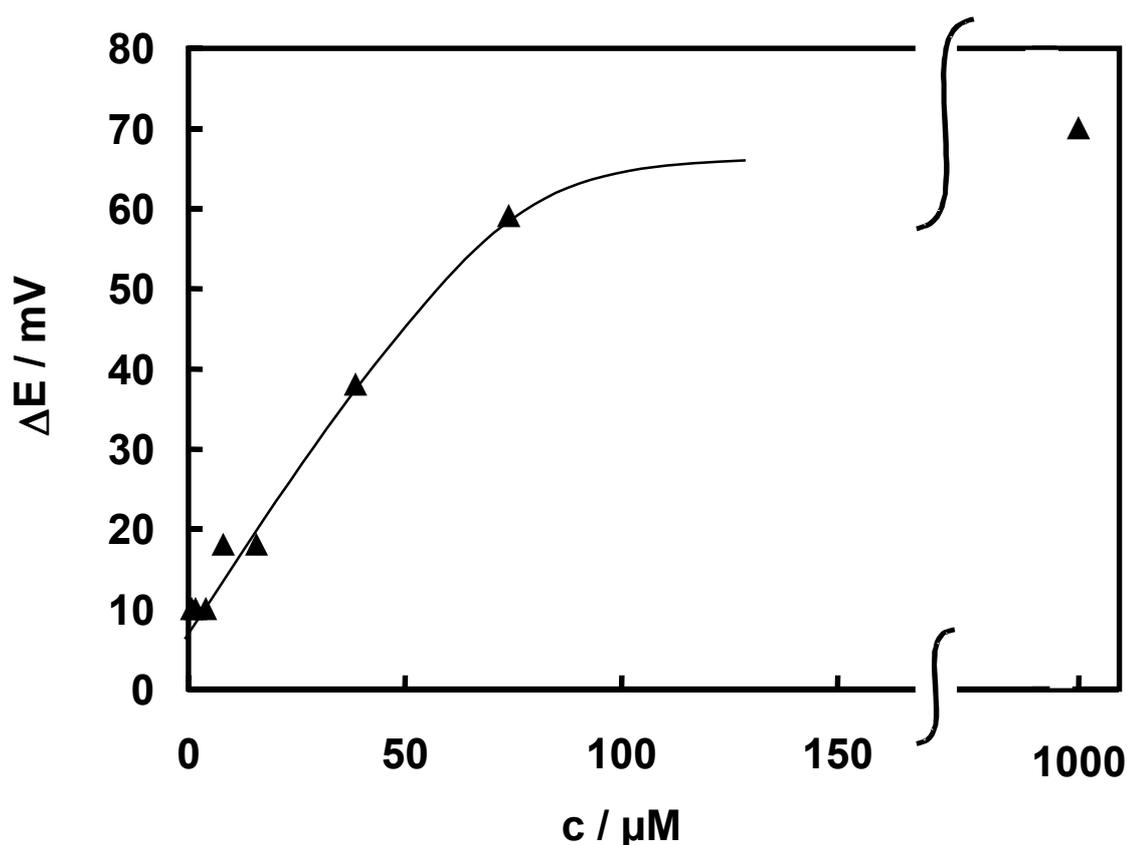


Abb. 3-11: Separation der cyclicvoltammetrischen Reduktions- und Oxidationspeaks des $\text{Fe(II)(CN)}_6^{4-}/\text{Fe(III)(CN)}_6^{3-}$ Redoxpaares als Funktion der Konzentration von Fe(CN)_6^{4-} an Thyroglobulin-modifizierter Gold-Scheibenelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$) in 0.1 M Citronensäurelösung, $\text{pH} = 2.5$

Sind die gemessenen Ströme bzw. Redoxwellen zu Beginn der Messung überwiegend auf oberflächenakkumulierte Redoxspezies zurückzuführen, so steigt mit Zunahme der Konzentration der diffusive Strombeitrag.

Die pH-Abhängigkeit der cyclicvoltammetrischen Oxidationsströme i_{p_a} und der Redoxpotentiale E^0 von Fe(CN)_6^{4-} , wurde bei einer kleinen Konzentration von $10.6 \mu\text{M}$ untersucht (Abb. 3-12, nächste Seite). Man wählte ebenfalls eine kleine Konzentration (10 mM) des Leitelektrolyten, um eine eventuelle Konkurrenz um elektrostatische Bindungsstellen an den Proteindomänen zu reduzieren. Bei pH-Werten ≥ 6 konnten keine Ströme (Quadrat) detektiert werden. In Richtung kleinerer pH-Werte kam es bei $\text{pH} = 4.2$ zum Einsetzen des Stromanstiegs, welcher dann innerhalb von 2 pH-Einheiten maximale Werte annahm.

Die Darstellung zeigt den sigmoidalen Verlauf der Titrationskurve, der halbmaximale Strom $i/2$ ist bei $\text{pH}_{i/2} = 3.5$ zu beobachten.

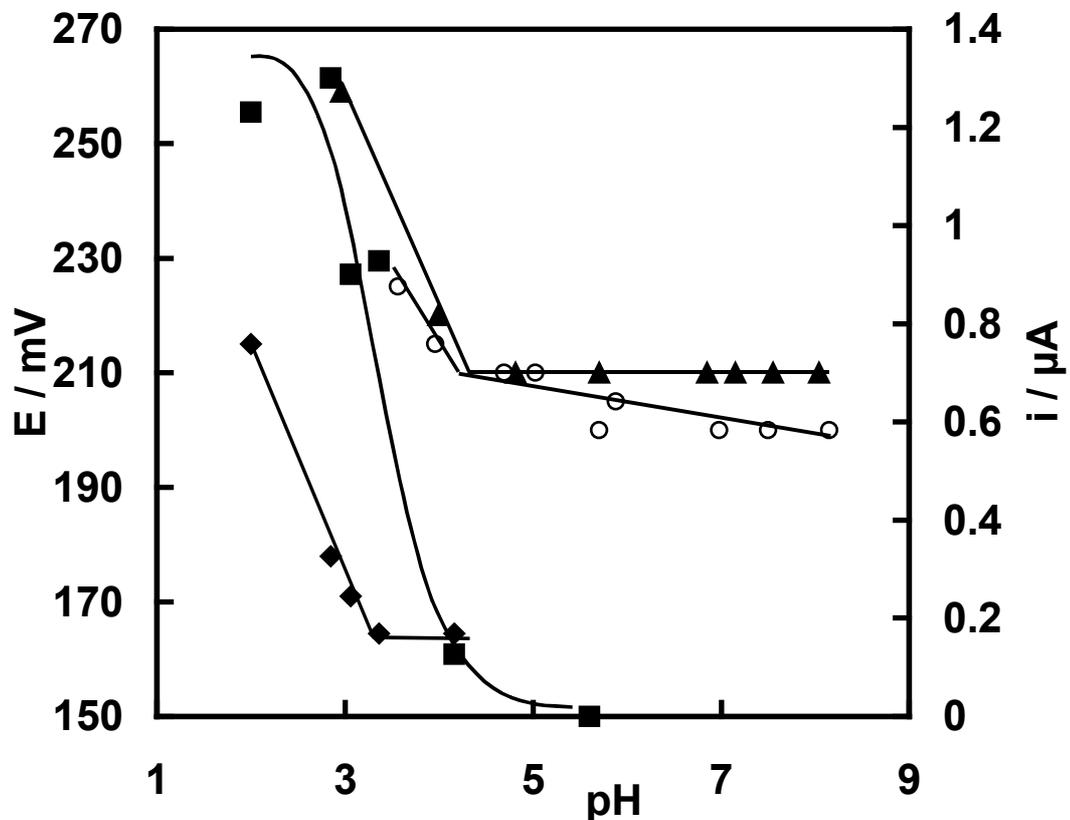


Abb. 3-12: i_p (Quadrate) und E^0 (Raute) von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ($c = 10.6 \cdot 10^{-6}$ M) aus CV an Thyroglobulin-modifizierter Goldelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$) in 0.1 M KCl, CV-Vorschubgeschwindigkeit: $\nu = 1 \text{ V/s}$, pH-Werte mit verdünnter HCl bzw. KOH eingestellt; Kreise: DPV-Redoxpotentiale bei $c(\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}) = 1 \text{ mM}$ an Thyroglobulin-modifizierter Goldelektrode; Dreiecke: DPV-Redoxpotentiale bei $c(\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}) = 1 \text{ mM}$ an blanker Goldelektrode, DPV: $\nu = 5 \text{ mV/s}$, Amplitude: 25 mV

Bei einer Konzentration von $10.6 \mu\text{M}$ wird der größte Teil der Stromantwort des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ auf die oberflächenfixierte Redoxspezies zurückgeführt, während Diffusionsbeiträge von gelöster Redoxspezies vernachlässigbar sind. Das Protein weist bei $\text{pH} = 6$ eine negative Nettoladung auf und repulsiert den Redoxmarker, welcher sich folglich nicht auf der Oberfläche anreichern kann. Mit Abnahme des pH-Werts wird das Protein zunehmend positiver und bindet damit $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ besser. Demnach spiegelt das Stromsignal die pH-abhängige Oberflächenkonzentration der Redoxspezies wieder. Die pH-abhängigen Redoxpotentiale E^0 (Rauten) sind bei $c(\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}) = 10.6 \mu\text{M}$ an der Protein-modifizierten Elektrode um etwa 50 mV ins Negative gegenüber den Redoxpotentialen bei 1 mM

Konzentration (Kreise und Dreiecke (*blanke* Elektrode)) verschoben. Dies lässt sich über die Stabilisierung des Fe(II)(CN)_6^{4-} durch elektrostatische Bindung an die Proteinschicht gegenüber dem $\text{Fe(III)(CN)}_6^{3-}$ erklären, d.h. $K_4 > K_3$. Die Oxidation läuft von Zustand 1 nach Zustand 4 (Abb. 3-13). Da das Produkt protoniert ist, wandert E^0 mit sinkendem pH-Wert in positiver Richtung (Interpretation gewagt). Die Protonierung von Carboxylatfunktionen in den Protein-Seitenketten führt zur Neutralisation negativer Ladungen und verursacht eine grössere Stabilisierung (= kleinere Destabilisierung) der reduzierten Redoxspezies Fe(II)(CN)_6^{4-} im Vergleich zur oxidierten Redoxspezies $\text{Fe(III)(CN)}_6^{3-}$, d.h. $K_{3,\text{H}^+} > K_{4,\text{H}^+}$ (Abb. 3-13).

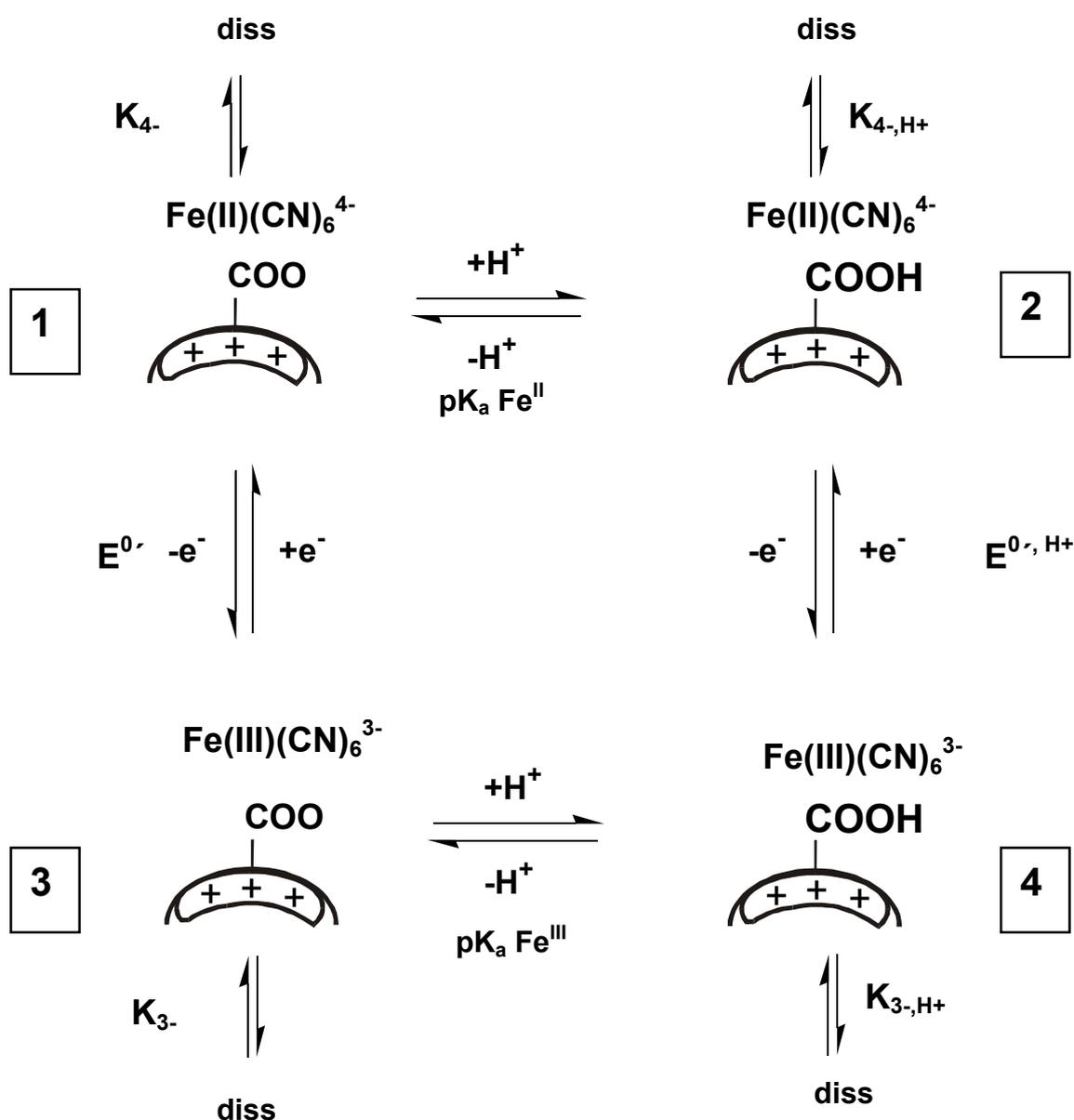


Abb. 3-13: gekoppelter Elektronen- und Protonentransfer an der Proteinschicht für Fe(II) / Fe(III)

Zusammenfassend wird festgehalten:

Die Akkumulation von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ an der Proteinschicht wurde nachgewiesen, sie äussert sich

- a) in dem positiven Y-Achsenabschnitt der Konzentrationsabhängigkeit des Oxidationsstromes von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (Abb. 3-9)
- b) in der linearen Abhängigkeit des Peakstroms im CV von der Potentialvorschubgeschwindigkeit (Abb. 3-10)
- c) in den kleinen Peakseparationen bei kleinen Konzentrationen (Abb. 3-11) (z.B.: $\Delta E_p = 10 \text{ mV}$ für $c = 10.6 \mu\text{M}$)
- d) im Versatz des E^0 von freiem $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, verglichen mit Oberflächen-koordiniertem (Abb. 3-12)
- e) in der pH-Abhängigkeit des beobachteten Halbstufenpotentials $E_{1/2}$ von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ für einen bestimmten pH-Bereich (Abb. 3-12)

3.4.2 Akkumulation von $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$

Wie für den Fall von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ bereits beschrieben, wird auch für kleine Konzentrationen von $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ Oberflächenakkumulation an einer Thyroglobulin-modifizierten Elektrode beobachtet. Die lineare Abhängigkeit des $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ -Reduktionsstromes von der Vorschubgeschwindigkeit bestätigt, dass bei alkalischen pH-Werten auch die positiv geladene Redoxspezies an der Proteinoberfläche akkumuliert wird (Abb. 3-14).

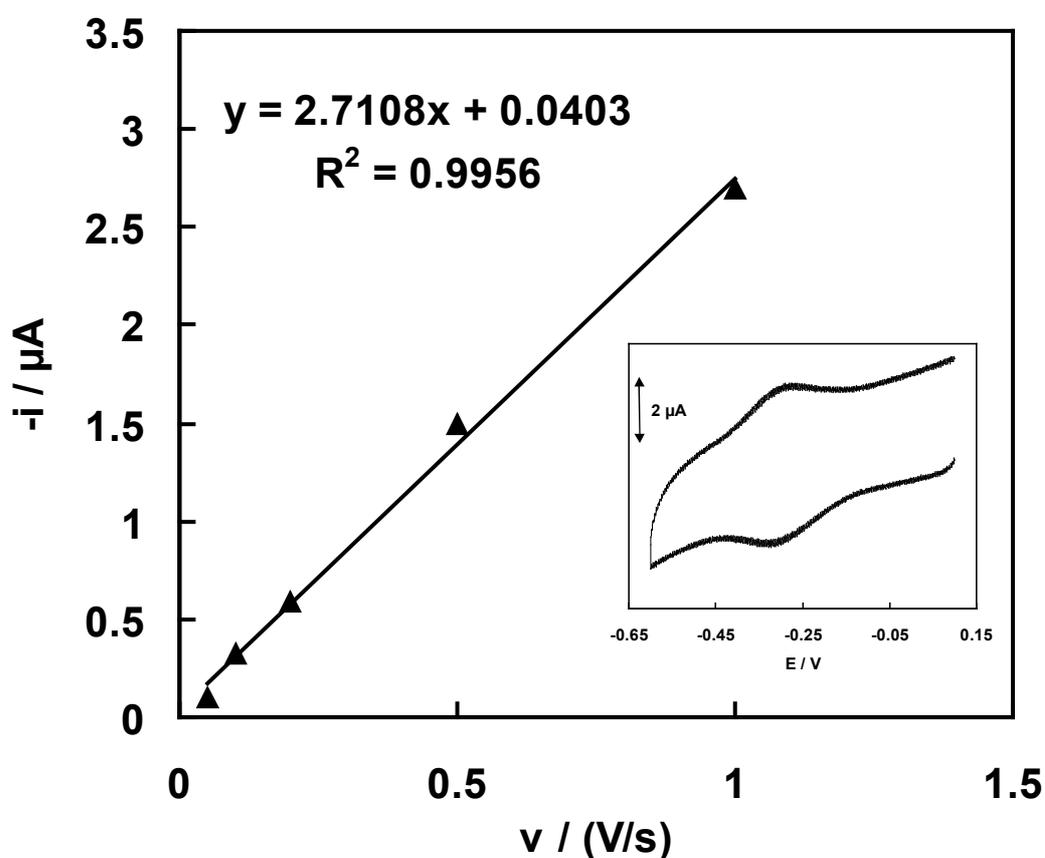


Abb. 3-14: Abhängigkeit des CV-Peakstroms der Hexaminruthenium-Oxidation von der Vorschubgeschwindigkeit an einer Thyroglobulin-modifizierten Gold-Scheibenelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$); $c(\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}) = 6.6 \mu\text{M}$ in 10 mM KCl; pH = 7.47, eingestellt mit verdünnter KOH-Lösung; Inset: $v = 0.2 \text{ V/s}$

Die Coulometrie (Integration der anodischen Redoxwelle) des im Inset von Abb. 3-14 gezeigten CVs liefert eine Oberflächenkonzentration von $1 \cdot 10^{-10} \text{ mol / cm}^2$.

Abb. 3-15 zeigt die pH-Abhängigkeit des cyclovoltammetrischen $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ -Reduktionsstromes und der zugehörigen Redoxpotentiale E^0 bei einer Konzentration von $6.6 \mu\text{M}$ an der Thyroglobulin-modifizierten Goldelektrode.

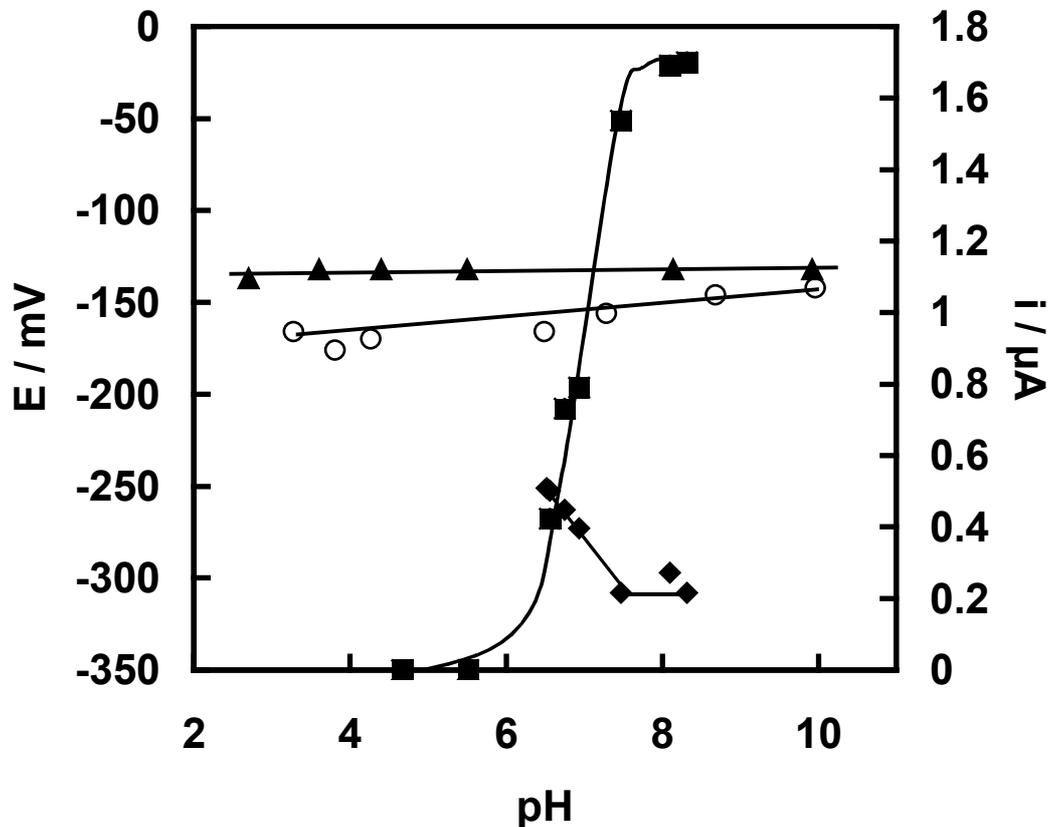


Abb. 3-15: i_{p_a} (Quadrate) und E^0 (Rauten) aus CV von $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ ($c = 6.6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) an Thyroglobulin-modifizierter Goldelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$) in 0.1 M KCl , CV: $v = 0.5 \text{ V / s}$, pH-Werte mit verdünnter HCl bzw. KOH eingestellt; Kreise: DPV-Redoxpotentiale bei $c(\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}) = 1 \text{ mM}$ an Thyroglobulin-modifizierter Goldelektrode; Dreiecke: DPV-Redoxpotentiale bei $c(\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}) = 1 \text{ mM}$ an blanker Goldelektrode; DPV: $v = 5 \text{ mV/s}$, Amplitude: 25 mV

Bei $\text{pH} \leq 6$ können keine Redoxströme (Quadrate) detektiert werden. Das Einsetzen des Stromes wird bei $\text{pH} = 6.5$ beobachtet. Mit steigendem pH-Wert nehmen die Ströme weiter zu und erreichen bei $\text{pH} \geq 7.5$ maximale Werte. Der halbmaximale Strom $i / 2$ ist bei $\text{pH}_{i/2} = 6.8$ zu beobachten. Man führt den Strom auf die oberflächenakkumulierte Redoxspezies zurück, während diffusive Beiträge von Redoxspezies in Lösung vernachlässigbar sind. Demnach spiegelt auch hier das Stromsignal die pH-Abhängigkeit der Oberflächenkonzentration der akkumulierten Redoxspezies wieder. Die pH-abhängigen Redoxpotentiale E^0 (Rauten) sind bei $c(\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}) = 6.6 \mu\text{M}$ an der Protein-modifizierten Elektrode um etwa 170 mV ins Negative verschoben gegenüber den Redoxpotentialen bei 1 mM Konzentration (Kreise und Dreiecke (*blanke* Elektrode)). Dies lässt sich durch die deutliche Stabilisierung des

$\text{Ru(III)(NH}_3)_6^{3+}$ (Zustand 1) durch elektrostatische Bindung an der Proteinschicht gegenüber dem $\text{Ru(II)(NH}_3)_6^{2+}$ (Zustand 3) erklären, d.h. $K_{3+} > K_{2+}$ (Abb. 3-16). Die Reduktion läuft von Zustand 1 nach Zustand 4. Protonierung von Imidazolgruppen ($\text{pK}_a = 6.04$) in den Protein-Seitenketten generiert positive Ladungen und verursacht eine größere Stabilisierung (= kleinere Destabilisierung) der reduzierten Redoxspezies Ru(II)(CN)_6^{2+} (Zustand 4) im Vergleich zur oxidierten Redoxspezies $\text{Ru(III)(CN)}_6^{3+}$ (Zustand 2), d.h. $K_{2+,H+} > K_{3+,H+}$. Daher wandert E^0 mit fallendem pH-Wert ins Positive.

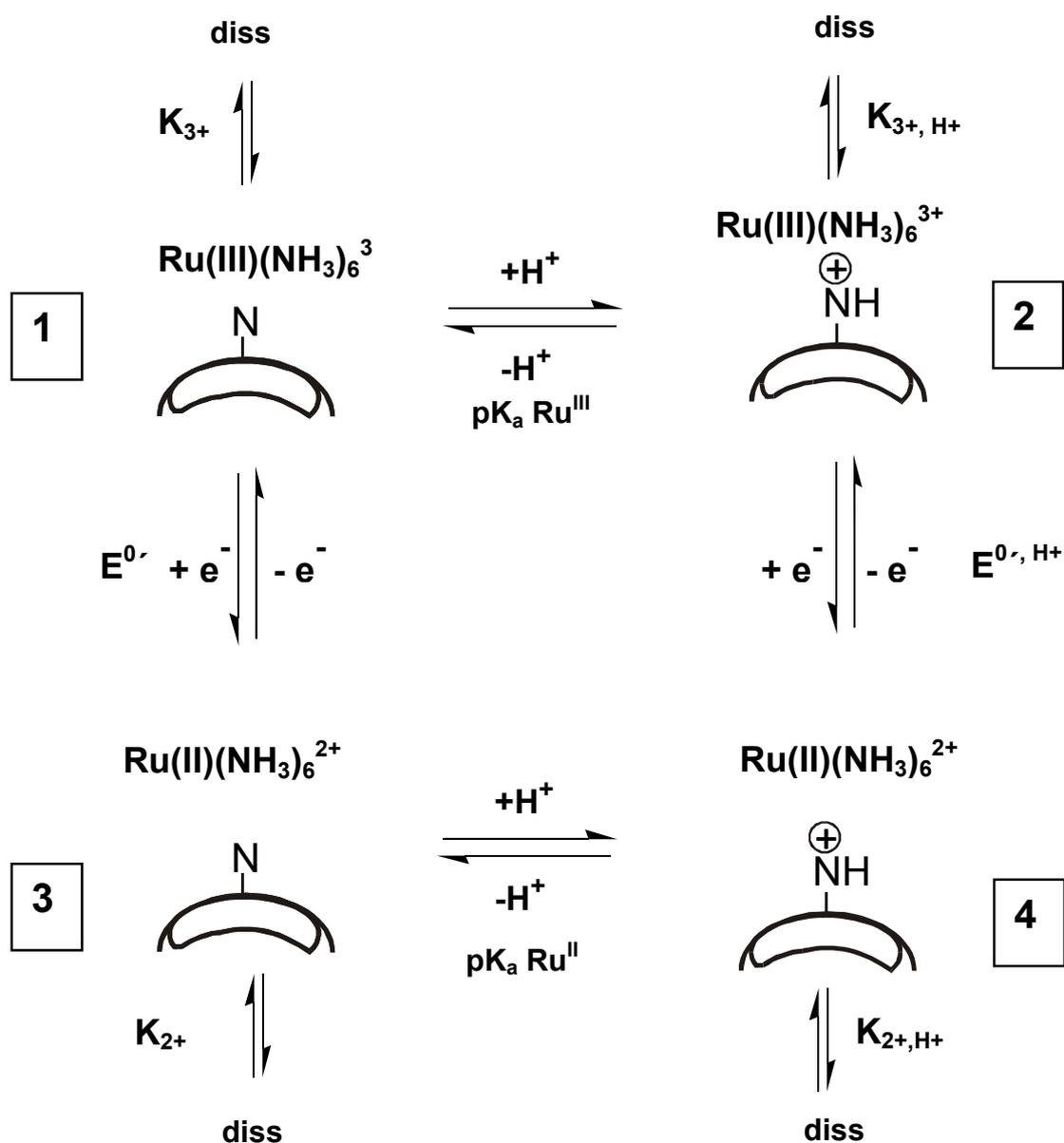


Abb. 3-16: gekoppelter Elektronen- und Protonentransfer für Ru(II)/Ru(III) an der Proteinschicht

Zusammenfassend wird festgehalten:

Die Akkumulation von $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ an der Proteinschicht wurde nachgewiesen, sie äussert sich

- a) in der linearen Abhängigkeit des Peakstroms im CV von der Potentialvorschubgeschwindigkeit (Abb. 3-14)
- b) in der kleinen Peakseparation ΔE_p ($= 17 \text{ mV}$)(Abb. 3-14)
- c) im Versatz des E^0 von freiem $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, verglichen mit Oberflächen-koordiniertem (Abb. 3-15)
- d) in der pH-Abhängigkeit des beobachteten Halbstufenpotentials $E_{1/2}$ von $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ für einen bestimmten pH-Bereich (Abb. 3-15)

Die Akkumulation von geladenen Redoxspezies an Polyelektrolytmembranen wurde erstmals von Anson et al. ^[121, 122] untersucht. In frühen Arbeiten verwendeten sie relativ dicke Schichten (einige μm) der Polyelektrolytmembranen auf Graphitelektroden. So war es möglich, die Akkumulation von hochgeladenen Redoxspezies in der Polyelektrolytmembran mit CV zeitlich aufzulösen.

Im Gegensatz zu Proteinschichten sind derartige Systeme nicht pH-schaltbar zwischen anionischer und kationischer Form.

Humble et al. ^[123] beobachteten an Microcystinen - potentiell hepatotoxischer Heptapeptide - Bindung von Cu^{2+} und Zn^{2+} . Mit steigender Microcystin-Konzentration fanden sie Verschiebungen der DPV-Reduktionspotentiale von Cu^{2+} und Zn^{2+} und Abnahme der DPV-Peakströme. Sie führten dies auf Chelatierung der Übergangsmetallionen durch die Microcystine zurück.

La-Scalea et al. ^[124] fanden an DNA-modifizierten GC Elektroden Verschiebungen des Peakpotentials der Benznidazol-Reduktion zu negativeren Werten der im Vergleich zur blanken GC -Elektrode. Dies führten sie auf elektrostatische Wechselwirkung des Benznidazols mit der DNA zurück.

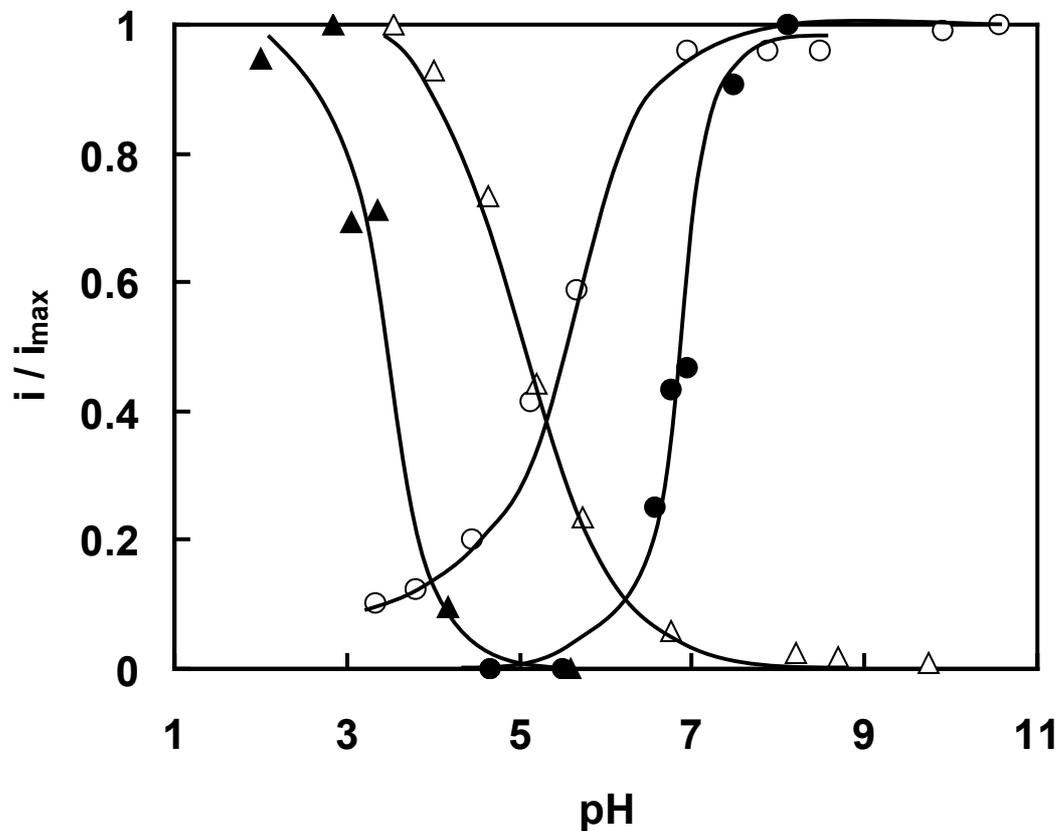
3.4.2.1 Vergleich der Strom-pH-Abhängigkeiten bei μM und 1mM Konzentrationen

Abb. 3-17: pH-Abhängigkeiten der normierten Redoxströme von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ und $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ an einer Thyroglobulin-modifizierten Goldelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$) bei unterschiedlicher Konzentration der Redoxspezies; weisse Dreiecke: 1 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ in 0.1 M KCl (DPV), schwarze Dreiecke: 10.6 μM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ in 10 mM KCl (CV, $\nu = 1 \text{ V/s}$), weisse Kreise: 1 mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ in 0.1 M KCl (DPV), schwarze Kreise: 6.6 μM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ in 10 mM KCl (CV, $\nu = 0.5 \text{ V/s}$); DPV: $\nu = 5 \text{ mV/s}$, Amplitude: 25 mV

Abb. 3-17 zeigt den Vergleich der normierten Strom-pH-Kurven bei 10.6 μM bzw. 6.6 μM und 1 mM Konzentrationen von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ und $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$. Im Vergleich zu der entsprechenden Titrationskurve bei 1 mM Konzentration weist die Strom-pH-Kurve von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ bei 10.6 μM eine Verschiebung um etwa 1.5 Einheiten in Richtung sauren pH-Werts auf und verläuft etwas steiler. Die Titrationskurve von $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ bei 6.6 μM ist um etwa 1.5 Einheiten in Richtung alkalischen pH-Werts verschoben und zeigt ebenfalls einen steileren Verlauf (Abb. 3-17).

Die pH-abhängigen Stromsignale sind auch abhängig von der Konzentration der Redoxspezies selbst.

3.4.3 Akkumulation von Viologen 1 unter Verdrängung von $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$

Als weitere positiv geladene Redoxspezies wurde 1,1'-Bis(2-ammonioethyl)-4,4'-bipyridinium **17**, fortan als Viologen **1** bezeichnet, im fünffachen bzw. zehnfachen Überschuss zur Messlösung ($6.6 \mu\text{M}$ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ in 10 mM KCl , siehe 3.4.2.) addiert.



Es ist eine Abnahme des $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ -Reduktionsstromes um ca. 50 % zu beobachten (Abb. 3-18).

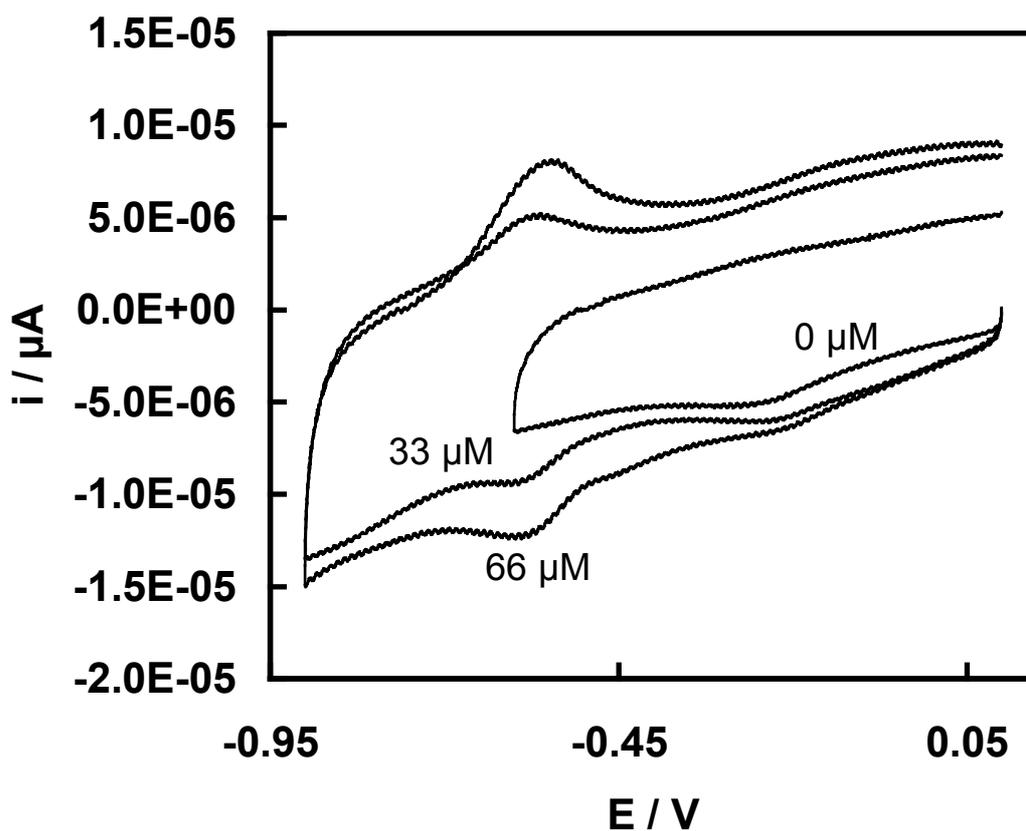


Abb. 3-18: CV von Viologen 1 (**17**) in Gegenwart von Hexaminruthenium an Thyroglobulin-modifizierter Goldelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$); c (**17**) = $33 \mu\text{M}$ bzw. $66 \mu\text{M}$, c ($\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$) = $6.6 \mu\text{M}$ in 10 mM KCl ; $\text{pH} = 7.47$, eingestellt mit verdünnter KOH -Lösung

Auch Viologen **1** zeigt die Charakteristika einer oberflächenadsorbierten Spezies, d.h. geringe Peakseparation der Viologen-Redoxwelle (10 mV) und lineare Abhängigkeit des anodischen Peakstromes von der Vorschubgeschwindigkeit (Abb. 3-19) in Gegenwart von $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$. Sind beide geladenen Redoxsysteme vorhanden, tritt zudem eine Konkurrenz um Oberflächenplätze ein. Es zeigt sich eine deutliche Abnahme der $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ -Redoxströme, offensichtlich wird $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ durch das Viologen von der Oberfläche verdrängt. Nach der ersten Zugabe von Viologen **1** ($c = 33 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) zeigt die Coulometrie der Reduktionswellen von $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ und Viologen **1** ein Verhältnis der Oberflächenkonzentrationen von $30 \cdot 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$ für $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ und $20 \cdot 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$ für Viologen **1**. Daraus ergibt sich ein Verhältnis der Bindungskonstanten $K_{\text{Ru(III)}} / K_{\text{Viol}}$ von 7.5.

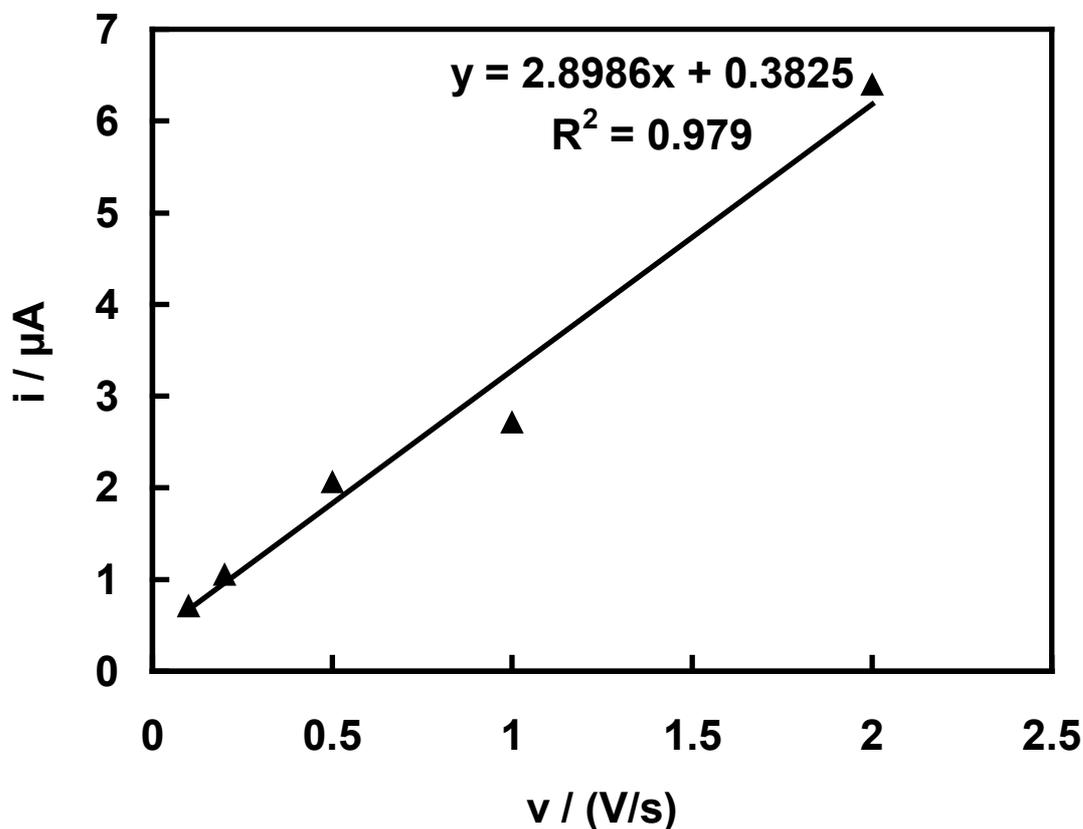


Abb. 3-19: Abhängigkeit des CV-Peakstroms der Viologen-Reduktion von der Vorschubgeschwindigkeit in Gegenwart von Hexamineruthenium an einer Thyroglobulin-modifizierter Gold-Scheibenelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$); c (Viologen) = $66 \mu\text{M}$, c ($\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$) = $6.6 \mu\text{M}$ in 10 mM KCl ; $\text{pH} = 7.47$, eingestellt mit verdünnter KOH -Lösung

3.4.4 Abhängigkeit des Elektronentransfers von der Ladung der Redoxspezies

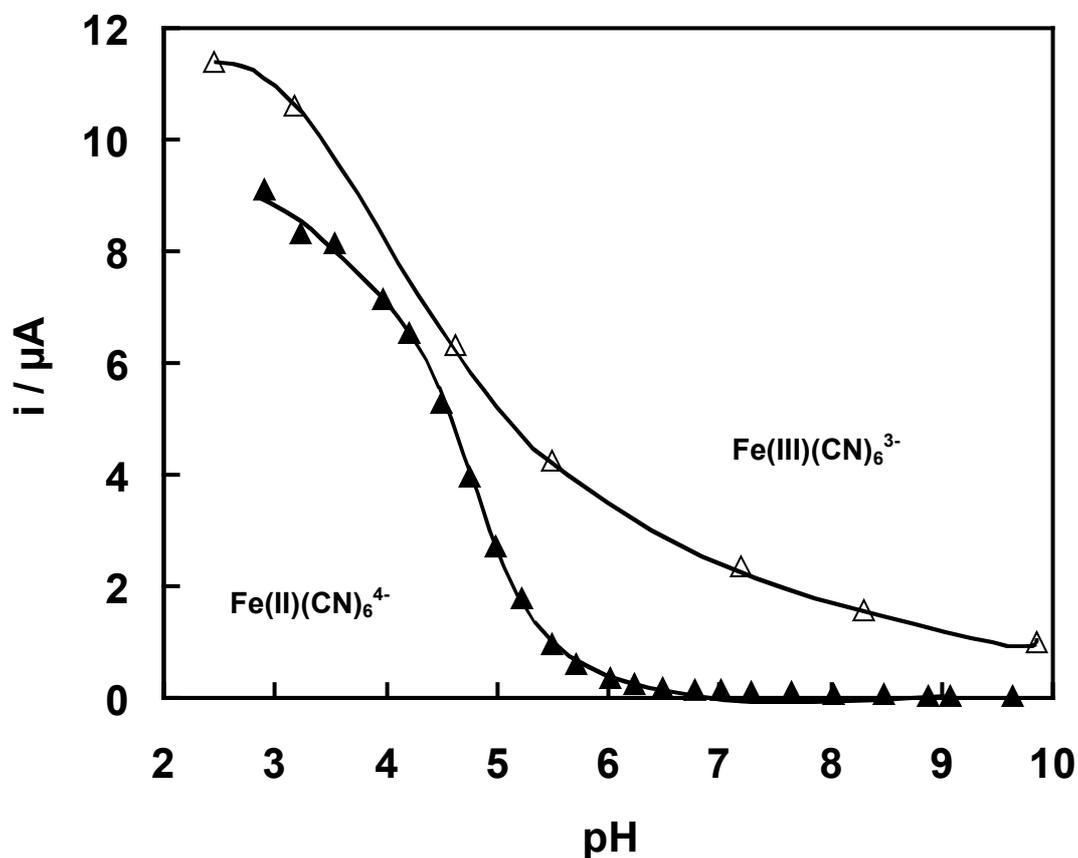


Abb. 3-20: pH-Abhängigkeit der DPV-Redoxströme an einer Thyroglobulin-modifizierten Gold-Scheibenelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$) in 0.1 M KCl; schwarze Dreiecke: 1 mM Fe(II)(CN)_6^{4-} ; weisse Dreiecke: 1 mM $\text{Fe(III)(CN)}_6^{3-}$; pH-Werte mit verdünnter HCl bzw. KOH eingestellt; $\nu = 5 \text{ mV/s}$, Amplitude: 25 mV

Die Tatsache, dass Hexacyanoferrat sowohl als Fe^{II} als auch als Fe^{III} -Verbindung zugänglich ist, erlaubt es, den Einfluss der Ladung der Redoxspezies auf die Strom-pH-Kurven zu untersuchen.

Die Titrationskurve mit $\text{Fe(III)(CN)}_6^{3-}$ verläuft deutlich flacher als diejenige mit dem Fe(II)(CN)_6^{4-} -Ion (Abb. 3-20). Zudem scheint die Blockade des Elektronentransfers bei hohem pH für Fe(CN)_6^{3-} deutlich schwächer ausgeprägt.

Offensichtlich ist nicht nur die Ladung des Proteins, sondern genauso sehr diejenige des Redoxmarkers für die Unterbindung der Elektronenschleuse verantwortlich. Setzt man Coulomb'sche Wechselwirkungen voraus, so ist dies auch zu erwarten.

3.4.4.1 Redoxspezies mit pH-abhängiger Ladung

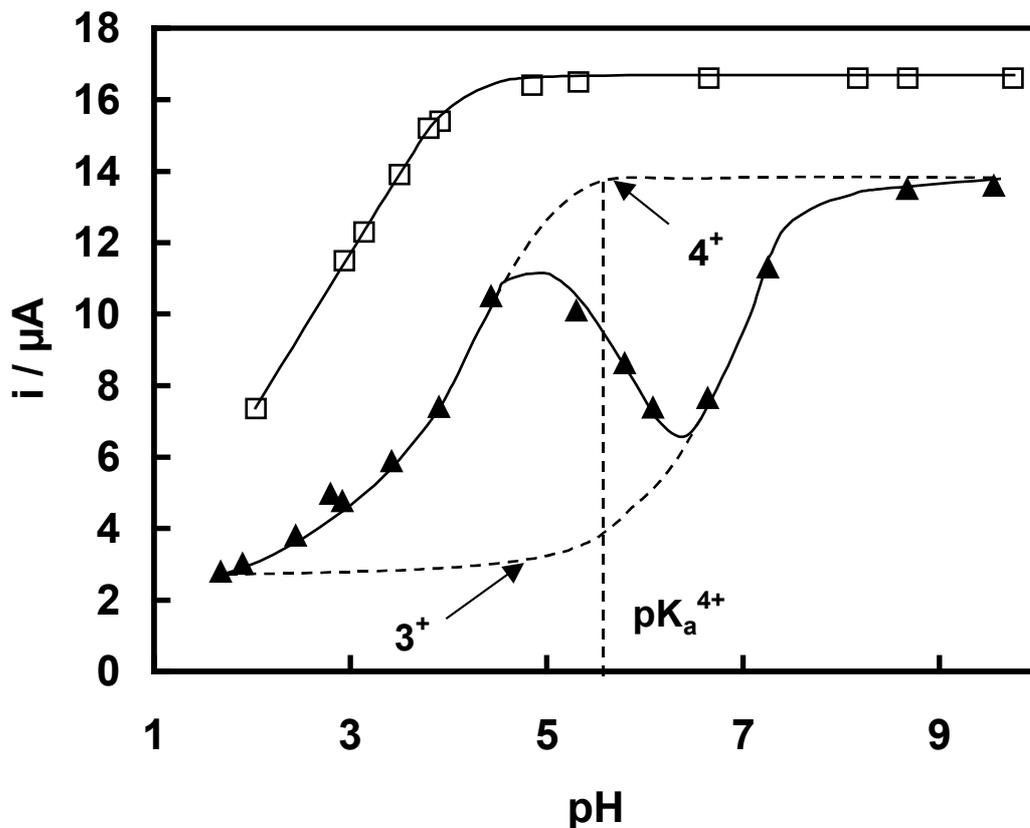


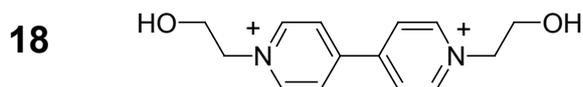
Abb. 3-21: pH-Abhängigkeit der DPV-Reduktionsströme von Viologen 1 (Dreiecke) und Viologen 2 (Quadrate) an einer Thyroglobulin-modifizierten Gold-Scheibenelektrode; 1 mM Viologen 1 bzw. 1 mM Viologen 2 in 0.1 M KCl; der pH-Wert wurde eingestellt mit 0.1 M HCl oder 0.1 M KOH; $v = 5$ mV/s, Amplitude: 25 mV; gestrichelte Kurven sind hypothetische Strom-pH-Verläufe einer theoretisch pH-unabhängig vierfach und dreifach positiv geladenen Viologen-Spezies

Der in Kap. 3.4.4 beobachtete Einfluss der Redoxmarkerladung konnte anhand des Viologens 1 bestätigt werden (Abb. 3-21, Dreiecke). Wie zuvor gezeigt wurde, spielt dabei sowohl die Ladung des Proteins, als auch die Ladung des Markers eine Rolle.

Bei Viologen **1** handelt es sich um ein leicht protonierbares Viologenderivat, dessen Aminfunktion durch die Anwesenheit des Viologen-Grundkörpers azidifiziert wird.

Eine elektrochemische Titration ergab für $\text{H}_3\text{N}^+-\text{Vio}^{++}-\text{NH}_3^+$ einen pKa -Wert von 5.4 (siehe Kap. 5.6.1). Mit steigendem pH-Wert wird das Protein zunehmend negativ geladen, dadurch erhöht sich kontinuierlich die generelle Affinität der Proteinschicht gegenüber positiv geladener Spezies in Lösung. Der Verlauf der Strom-pH-Abhängigkeit in Abb. 3-21 ist daher nur mit einer Affinitätsänderung der Redoxspezies, gegenüber der Proteinschicht bzw. der Verminderung seiner positiven Ladung zu erklären, die durch Deprotonierung des Vio^{4+} verursacht wird. Ausgehend von $\text{pH} = 2.5$ bewirkt das Anheben des pH-Wertes zunächst die Deprotonierung von Carboxylfunktionen in den Protein-Seitenketten. Das vierfach positiv geladene Viologen weist eine hohe Affinität zu den negativen Domänen auf und reichert sich rasch in hoher Konzentration auf der Oberfläche an, so dass die Reduktionsströme entsprechend schnell ansteigen. In Abb. 3-21 ist der pKa-Wert von $\text{H}_3\text{N}^+-\text{Vio}^{++}-\text{NH}_3^+$ ($\text{pKa} = 5.4$) eingezeichnet, den man aus dem $E^0 - \text{pH}$ -Diagramm (siehe Experimenteller Teil) ermittelt hat. Bei $\text{pH} > 4.5$ wird das Viologen zunehmend deprotoniert, d.h. es verliert eine positive Ladung. Folglich sinkt die Lösungskonzentration der vierfach positiv geladenen Spezies und sie verarmt zunehmend an der Oberfläche, so dass ein Sinken der Reduktionsströme verursacht wird. Währenddessen sollten bei $\text{pH} = 6$ die Carboxylgruppen der Protein-Seitenketten weitestgehend deprotoniert sein. Die *dreifach* geladene Viologen-Spezies hat eine verminderte Affinität zu negativen Protein-Domänen. Ebenfalls werden Histidine in den Seitenketten deprotoniert, d.h. positive Ladungen in der Schicht werden eliminiert. Die dreifach geladene Viologen-Spezies reichert sich zunehmend auf der Oberfläche an, die Reduktionsströme steigen auf maximale Werte ($\text{pH} > 8$).

Die Strom-pH-Abhängigkeit von 1,1'-Bis(2-hydroxyethyl)-4,4'-bipyridinium **18**, fortan als Viologen **2** bezeichnet, bestätigt die getroffenen Annahmen (Abb. 3-21, Quadrate).



Viologen **2** ist unabhängig vom pH-Wert zweifach positiv geladen. Der Reduktionsstrom ist im pH-Intervall 5-10 konstant maximal. Bei $\text{pH} < 5$ ist Abnahme des Stromes festzustellen, bei $\text{pH} = 2$ um etwa 50 %. Offensichtlich erfährt Viologen **2** geringere Repulsion bei kleinen pH-Werten als Viologen **1**. Daher sind schon bei vergleichsweise kleinen pH-Werten maximale Ströme zu beobachten.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Strom-pH-Abhängigkeiten die Affinitäten zwischen Redoxspezies *und* Proteinschicht als Funktion des pH-Werts reflektieren. Diese wird sowohl durch das Attraktionspotential der Proteinschicht, d.h. der Nettoladung des Proteins bedingt, als auch durch das Attraktionspotential der Redoxspezies, d.h. seiner Nettoladung. Daher spielen im Falle einer Redoxspezies, die selber eine pH-abhängige Veränderung ihrer Gesamtladung erfährt, das pH-Verhalten des Proteins *und* der Redoxspezies eine Rolle.

3.5 Modell des Elektronentransfers durch eine Proteinschicht

Aufgrund der bisher beobachteten Phänomene (Anreicherung geladener Redoxspezies an der Proteinschicht, Konzentrations- und Ladungsabhängigkeit des Elektronentransfers) wird ein vereinfachtes Modell formuliert, welches den Elektronentransfer durch Proteinschichten erklärt.

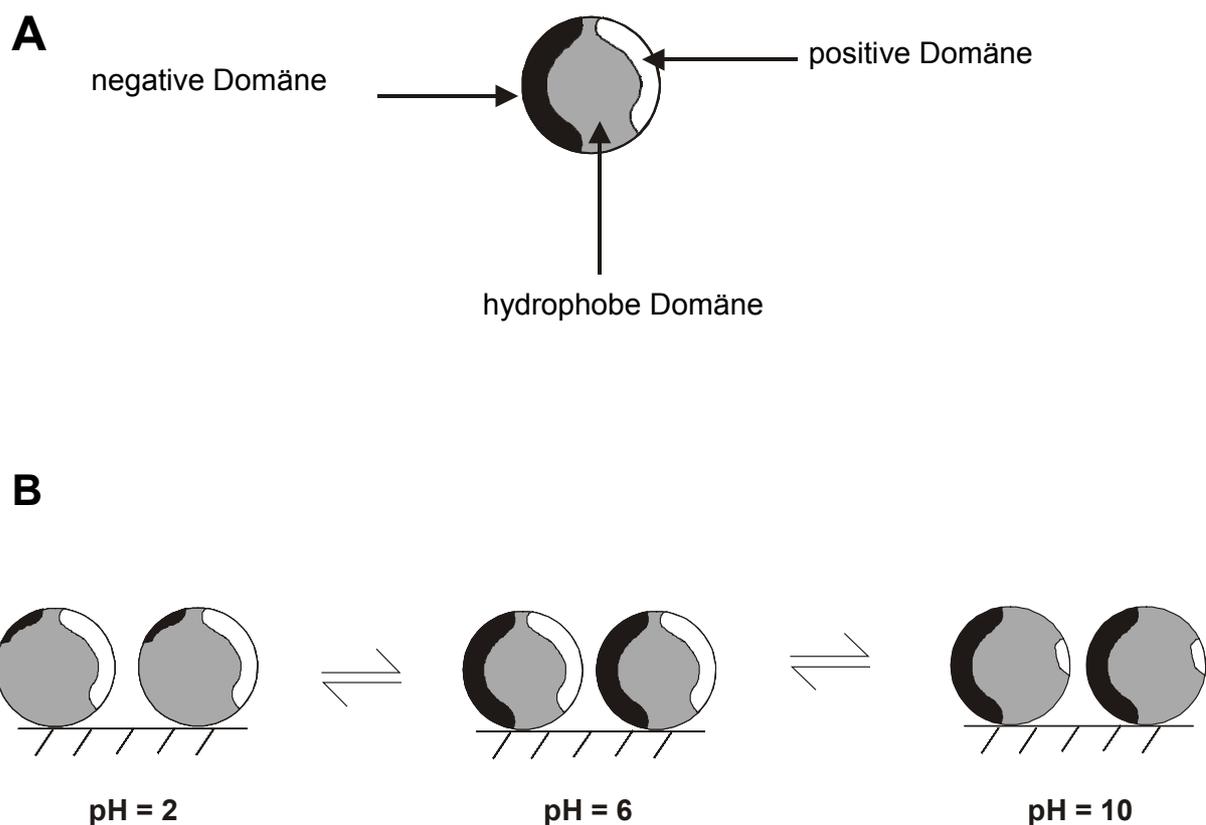


Abb. 3-22: A: Modell eines globulären Proteinmoleküls, bestehend aus zusammengefassten negativen (schwarz), positiven (weiß) und ungeladenen (grau) Domänen; in wässriger Lösung sind geladene Domänen vorzugsweise auf der Moleküloberfläche angeordnet, während hydrophobe Bereiche ins Molekülinnere gefaltet sind;

B: Modell der pH-abhängigen, schematischen Ladungsverteilung in einer Proteinschicht

Man betrachtet das Protein als ein für die Redoxspezies undurchdringliches globuläres Molekül, welches geladene funktionelle Gruppen bevorzugt auf der Aussenseite trägt, wohingegen hydrophobe Domänen ins Molekülinnere gerichtet sind. Die Elektrode ist mit einer Monolage des ampholytischen Moleküls von mehreren Nanometern Dicke bedeckt.

Heterogener Elektronentransfer ist nur an Lücken zwischen benachbarten Proteinmolekülen möglich, an denen die Goldoberfläche weiterhin unbedeckt vorliegt. Befindet sich nur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ in der sauren KCl-Lösung, wird die Redoxspezies elektrostatisch an positiven Proteindomänen gebunden, d.h. an Ammoniumfunktionen und / oder Histidinen der Polypeptid-Seitenketten, die in vergleichbarer Weise wie saure Anionenaustauscher funktionieren. Folglich wird das $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ an der Oberfläche aufkonzentriert, d.h. es liegt direkt an der Grenzfläche in den positiven Proteindomänen in höherer Konzentration vor als in Lösung.

Elektronen-Selbstaustausch zwischen den benachbarten, elektrostatisch gebundenen Redoxzentren kann derart erfolgen, dass die Ladung von heran diffundierender Redoxspezies an der äußeren Proteinsphäre durch die akkumulierte Spezies aufgenommen wird und durch eine Selbstaustausch-Kette zur Goldelektrode fließt. Somit wird der heterogene Elektronentransfer ermöglicht, ohne dass die Redoxspezies aus der Lösung bis hin zur blanken Goldelektrode an den zwischenmolekularen Spalten diffundiert. Dieser Mechanismus des Ladungstransfers und der Aspekt der Präkonzentration der Redoxspezies erklären die hohen Oxidationströme, die bei sauren pH-Werten für $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, trotz voller Bedeckung mit der Proteinschicht, beobachtet werden und vergleichbar mit denen sind, die unter ansonsten gleichen Bedingungen an einer blanken Elektrode gemessen werden. In Abb. 3-23 ist diese Vorstellung grafisch dargestellt.

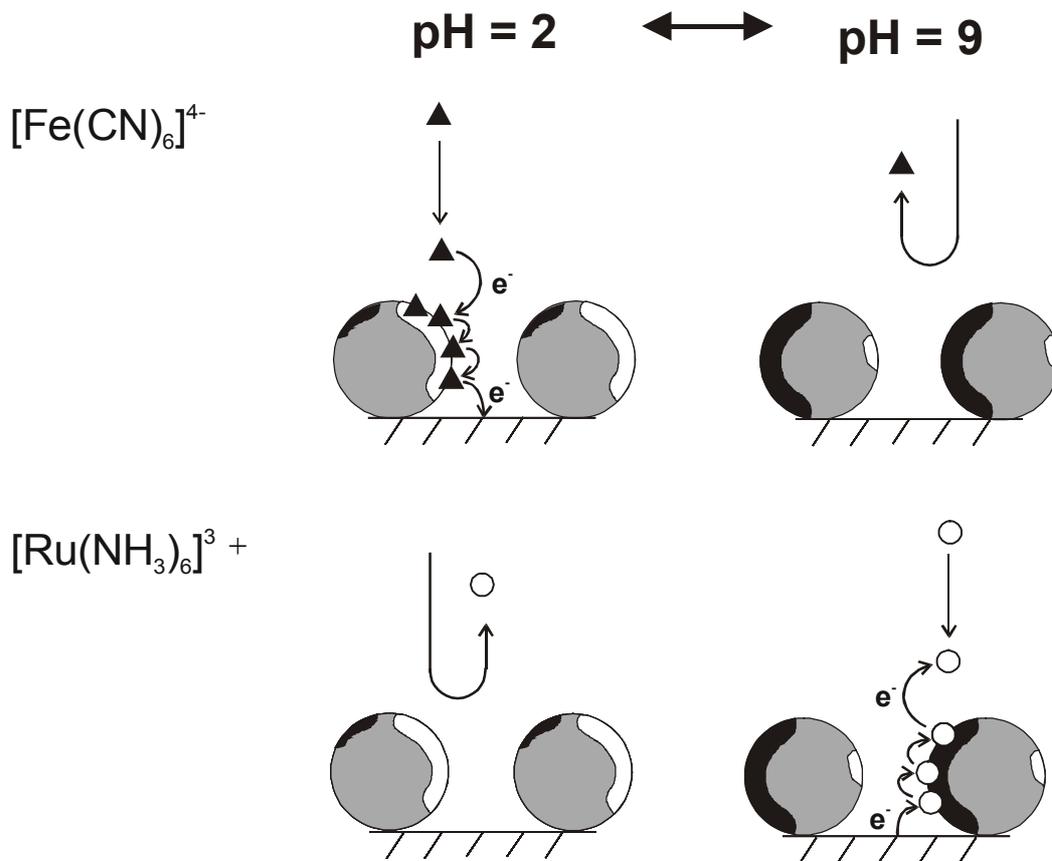


Abb. 3-23: Schematische Darstellung des Elektronentransfers durch eine Proteinschicht:

Geladene Redoxmarker dringen in die gegenseitig geladene Proteinschicht ein und reichern sich in entgegengesetzt geladenen Domänen an. Das Protein fungiert als Ionenaustauscher. Innerhalb der oberflächenakkumulierten Spezies kann der Elektronentransfer zur Elektrode durch Selbstaustausch erfolgen, nach pH-Änderung repulsiert das Protein die Redoxspezies, das Eindringen in die Schicht und die Anreicherung werden unterbunden und der Elektronentransfer unterdrückt.

Es ergeben sich folgende Konsequenzen bzw. Erklärungen für die bisher beobachteten Phänomene:

1. Heterogener Elektronentransfer ist nur an Lücken zwischen den adsorbierten Proteinen möglich. Das Durchdringen der dichten und insbesondere hydrophoben inneren Anteile der Proteine, ist für die hochgeladenen Redoxproben *nicht möglich*.
2. Der Anteil positiv bzw. negativ geladener Protein-Domänen lässt sich durch pH-Veränderung einstellen.
3. An der Oberfläche der Proteine findet ein effizienter Ionenaustausch durch die hochgeladenen Redoxproben statt, wenn entsprechend umgekehrt geladene Protein-Domänen zur Verfügung stehen.
4. Zwischen oberflächengebundener Redoxspezies untereinander, mit der Goldoberfläche und mit ungebundener Redoxspezies in Lösung findet ein effizienter Elektronentransfer statt, wenn die Beladung der Proteinoberfläche genügend groß ist.
5. Liegen pH-Verhältnisse vor, die keinen Ionenaustausch zulassen, so gibt es zumindest für hochgeladene Redoxspezies keinen diffusiven Weg durch die gleichgeladenen Protein-Protein-Zwischenräume.

Das Modell lässt sich weiter verifizieren:

- I. Wenn, wie in 4. behauptet, Elektronentransfer nur zwischen an der Proteinoberfläche adsorbierten Redoxspezies und der Elektrodenoberfläche einerseits, und in Lösung befindlichen Redoxproben andererseits möglich ist, müsste sich der Strom durch Zugabe einer der Redoxprobe gleichgeladenen, aber redoxinaktiven Spezies unterdrücken lassen.
- II. Aus den gleichen Gründen sollte es möglich sein, über die Elektronentransferkette ein anderes Redoxsystem in Lösung anzukoppeln (Elektrokatalyse).

3.6 Suppression des Elektronentransfers

Die vermutete Suppression des Stromes durch eine gleichgeladene, redoxinaktive Spezies konnte wie folgt nachgewiesen werden: Abb. 3-24 zeigt die Abhängigkeit des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Oxidationsstroms an der Thyroglobulin-modifizierten Gold-Scheibenelektrode von der Konzentration von Trinatriumnaphthalintrisulfonat **19** als weitere mehrfach negativ geladene, elektroinaktive Spezies. Die Messungen wurden bei $\text{pH} = 2.5$ durchgeführt, demzufolge hat die Proteinschicht eine positive Nettoladung und $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ zeigt eine maximale Stromantwort.

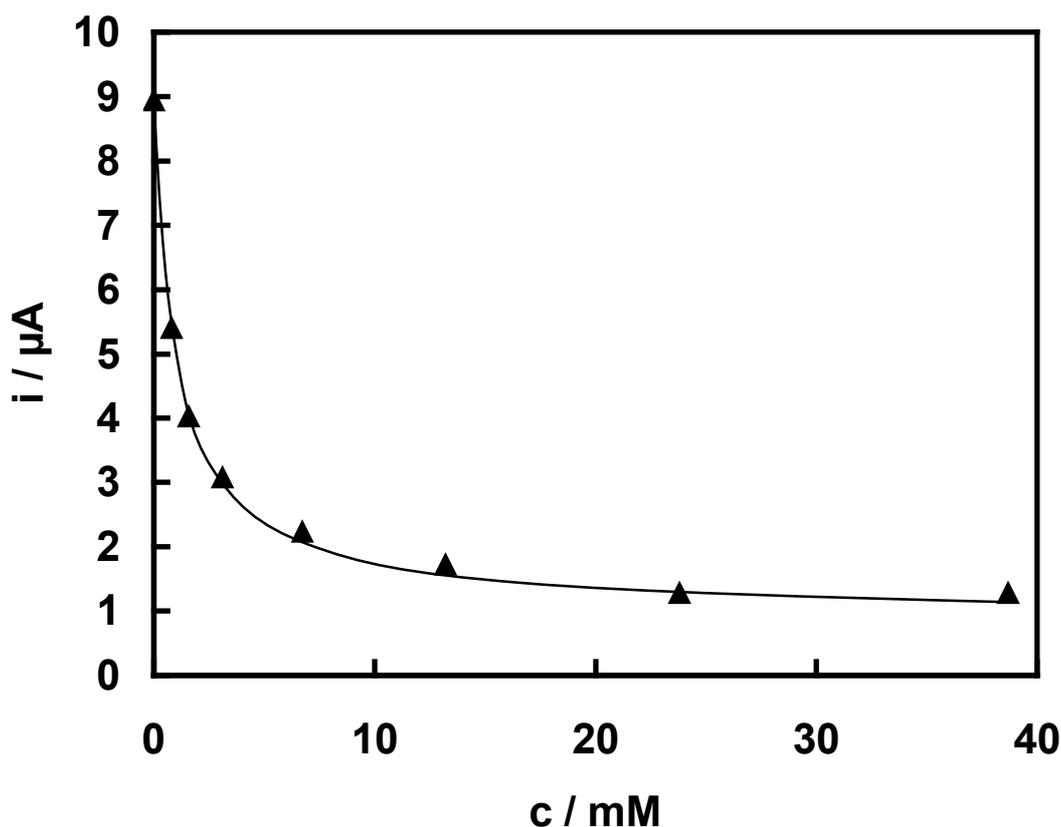
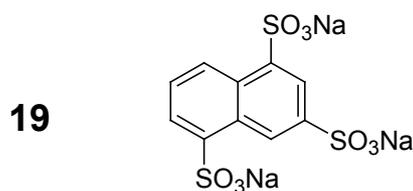


Abb. 3-24: Abhängigkeit des differentiell-pulsvoltametrischen $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Oxidationsstroms an einer Thyroglobulin-modifizierten Elektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$) in 0.1 M KCl von der Naphthalintrisulfonat-Konzentration in Lösung; $c(\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}) = 1 \text{ mM}$, $\text{pH} = 2.5$, eingestellt durch Zufügen von 0.1 M HCl ; $v = 5 \text{ mV/s}$, Amplitude: 25 mV

Bei einer Konzentration von 0.8 mM Naphthalintrisulfonat ist der Oxidationsstrom des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ um nahezu 50 % reduziert und wird mit ansteigender Naphthalintrisulfonat-Konzentration weiter verringert, um bei $c = 20 \text{ mM}$ einen Minimalwert anzunehmen, der etwa 15 % des Ausgangswertes entspricht. An einer blanken Goldelektrode zeigt sich kein Einfluss des Naphthalintrisulfonats, der Oxidationsstrom bleibt unverändert (hier nicht gezeigt).

Offensichtlich verdrängt das elektroinaktive Naphthalintrisulfonat $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ von den elektrostatischen Bindungsstellen und unterbricht damit zunehmend die Elektronen-Selbstaustauschkette, was sich in einer Abnahme des Oxidationsstroms äußert. Schließlich kollabiert die Selbstaustauschkette und der Strom nimmt einen konstanten Minimalwert an, der eventuell durch Diffusion der Redoxspezies aus der Lösung, bis hin zur blanken Elektrodenoberfläche aufrecht erhalten wird (Abb. 3-25).

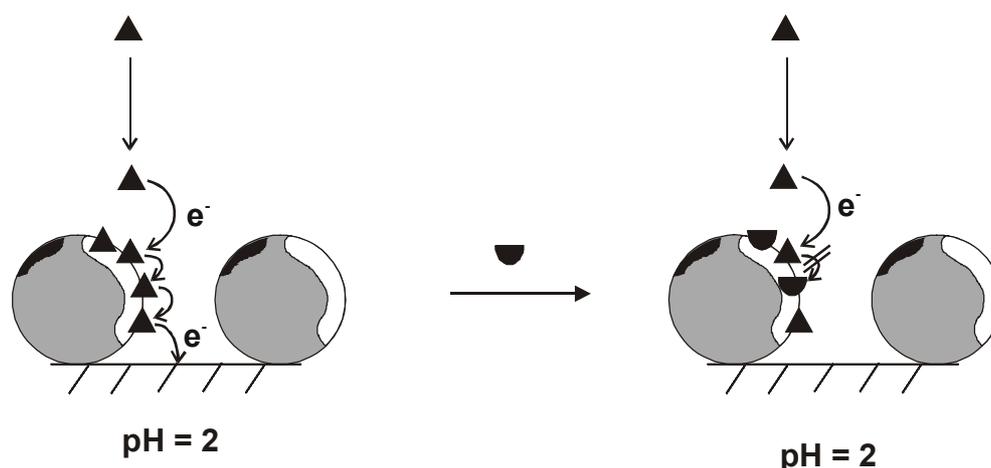


Abb. 3-25: Schematische Darstellung, der Unterdrückung des Elektronentransfers von Hexacyanoferrat an einer positiv geladenen Proteinschicht, durch Konkurrenz und Verdrängung mit Naphthalintrisulfonat (schwarzer Halbkreis), als negativ geladene, elektroinaktive Spezies, Zusammenbruch der Selbstaustausch-Kette, Unterdrückung des Elektronentransfers

Es wird hier erstmals eine mechanistische Erklärung der Unterdrückung der Stromantwort einer Redoxspezies gegeben, obschon das Prinzip in der Literatur häufig Verwendung fand, elektroinaktive Spezies indirekt zu detektieren.

So detektierte man über die Suppression der Redoxantwort einer Spezies in Lösung an modifizierten Elektroden anorganische Anionen^[83] und Kationen^[77], organische Polykationen^[84] und Nukleotide.^[93]

3.7 Induktion des Elektronentransfers

3.7.1 Induktion durch elektroinaktive Spezies

3.7.1.1 Ca^{2+} induziert $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Ströme

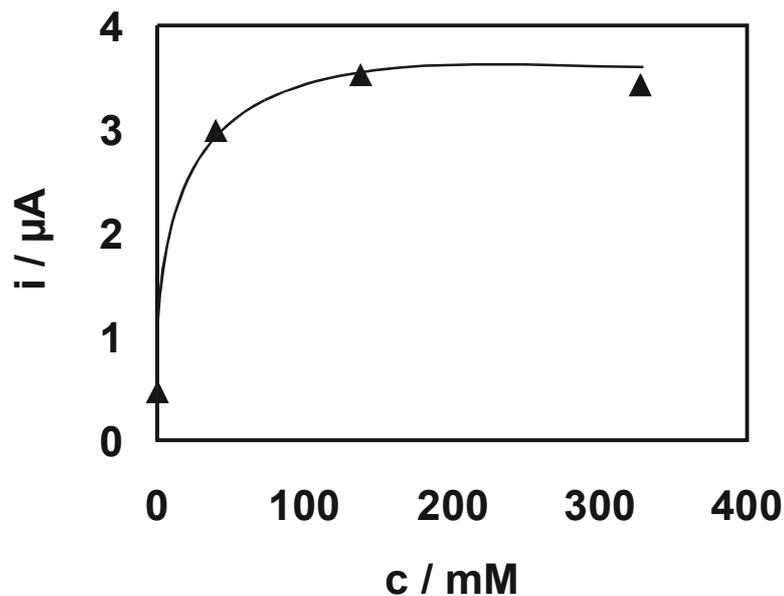


Abb. 3-26: Abhängigkeit des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Oxidationsstroms (DPV) an einer Thyroglobulin-modifizierten Elektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$) in 0.1 M KCl von der Ca^{2+} -Konzentration in Lösung; $c(\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}) = 1 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7.8$, eingestellt durch Zufügen von 0.1 M KOH; $\nu = 5 \text{ mV/s}$, Amplitude: 25 mV

Die Abhängigkeit des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Oxidationsstroms von der Konzentration Ca^{2+} an einer Thyroglobulin-modifizierten Gold-Scheibenelektrode ist in Abb. 3-26 dargestellt.

Bei $\text{pH} = 7.8$ ist unter Abwesenheit von Ca^{2+} der Elektronentransfer zum $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ vollständig blockiert. Nach der ersten Addition von Ca^{2+} lag dieses $40 \mu\text{M}$ in Lösung vor und verursachte einen Stromanstieg auf etwa $3 \mu\text{A}$.

Bei $\text{pH} = 7.8$ liegen die Carboxylgruppen in den Aminosäure-Seitenketten bevorzugt deprotoniert vor. Ca^{2+} wird von den Carboxylaten stark gebunden. Bei Zugabe dieses Erdalkaliions wird deshalb eine negativ geladene Domäne neutralisiert bzw. sogar umgepolt. Auf diese umgepolte Domäne scheint sich wiederum das $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ zu setzen und damit einen „Elektronen-Shuttle-Mechanismus“ zu eröffnen. Das Modell sollte deshalb um den in Abb. 3-27 (siehe nächste Seite) gezeichneten Fall erweitert werden.

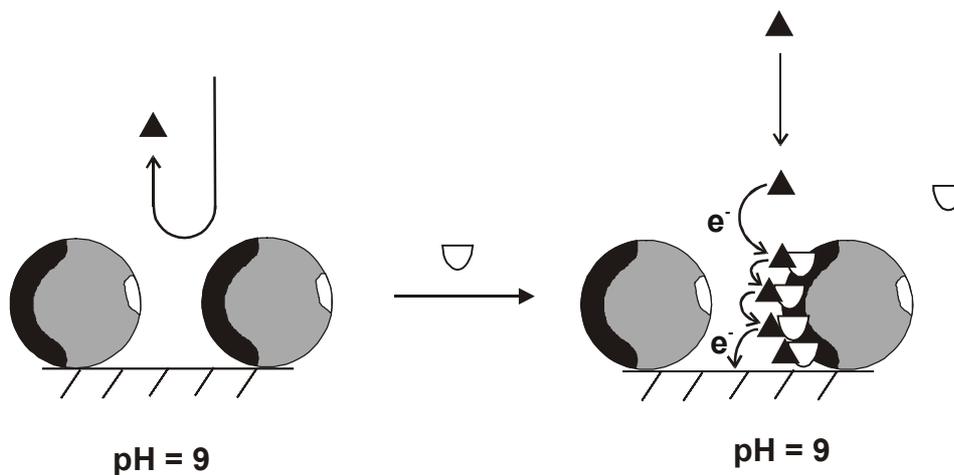


Abb. 3-27: Induktion des Elektronentransfers von negativ geladenem Hexacyanoferrat (Dreieck) durch die negativ geladene Proteinschicht bewirkt durch Anreicherung von Ca²⁺ (weisser Halbkreis) in negativ geladene Proteindomänen (schwarz), die dadurch umgepolt werden; Hexacyanoferrat akkumuliert sich in zweiter Sphäre auf dem angereicherten Ca²⁺

Die Induktion der Redoxantwort einer geladenen Redoxspezies in Lösung durch Bindung einer elektroinaktiven Spezies an einer modifizierten Elektrode fand zahlreiche Anwendung und wird hier erstmals mechanistisch erklärt.

Takehara et al.^[103] bestimmten Ca²⁺ durch Induktion der Redoxantwort von Fe(CN)₆³⁻ an Glutathion-modifizierten Goldelektroden. Bei einer Konzentration von 10 mM Ca²⁺ beobachteten sie an der zuvor vollständig den Elektronentransfer blockierenden Elektrode Redoxströme, die mit denen an blanken Elektroden vergleichbar waren. Durch die vergleichsweise hohe Dichte der Carboxylatgruppen in der Glutathionschicht wird Ca²⁺ entsprechend stärker gebunden als an der Thyroglobulinschicht. So ist die „Umpolungs-Effizienz“ grösser und damit die Induktion verstärkt. Ebenfalls konnten Takehara et al.^[79] nach dem gleichen Verfahren Lanthanid-Ionen in Konzentrationen von wenigen μM detektieren. Die hochgeladenen Kationen werden noch stärker an die Carboxylatgruppen gebunden und bewirken so bei kleinen Lösungskonzentrationen die Umpolung der modifizierten Oberfläche. Dies wird durch die Arbeit von Jiang et al.^[76] bestätigt.

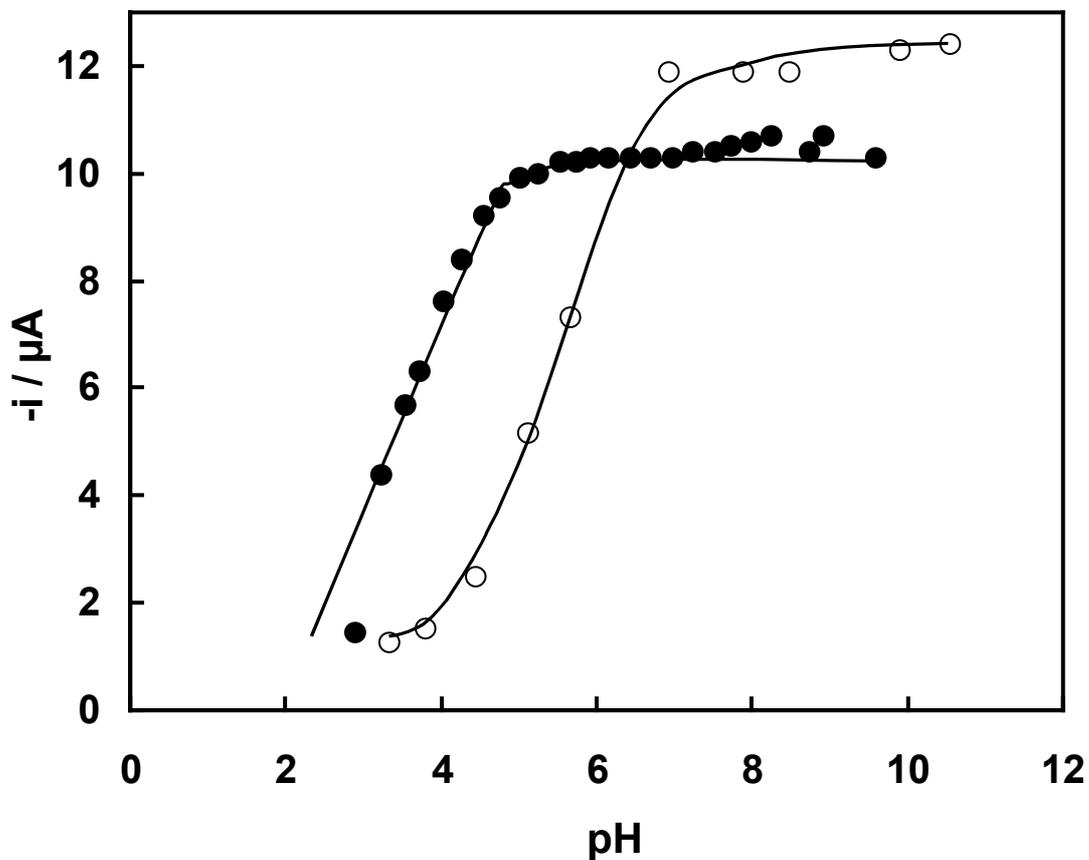
3.7.1.2 Citrat induziert $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ -Ströme

Abb. 3-28: pH-Abhängigkeit der DPV-Reduktionsströme von $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ an einer Thyroglobulin-modifizierten Gold-Scheibenelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$); weißer Kreis: 1 mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ in 0.1 M KCl, schwarzer Kreis: 1 mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ in Citronensäure / Natriumhydrogenphosphat-Puffer ($c = 0.1 \text{ M}$); der pH-Wert wurde eingestellt durch Zufügen von 0.1 M HCl oder 0.1 M KOH; $\nu = 5 \text{ mV/s}$, Amplitude: 25 mV

Bei den ersten Strom-pH-Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Natriumphosphat / Citronensäure-Gemisch ($c = 0.1 \text{ mol/l}$) als Puffer und Leitelektrolyt verwendet (siehe Tab. 3-2). Erst zu einem späteren Zeitpunkt erkannte man den signifikanten Einfluss dieses Elektrolyten auf die pH-Abhängigkeit des Reduktionsstromes von $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ an einer Protein-modifizierten Elektrode. Abb. 3-28 zeigt die Strom-pH-Abhängigkeiten, die für die Reduktion $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ an einer Protein-modifizierten Elektrode gemessen wurden in 1.) einem Natriumphosphat / Citronensäure-Gemisch (schwarzer Kreis) und 2.) einer ungepufferten 0.1 M KCl-Lösung (weisser Kreis), deren pH-Wert durch Zugabe von verdünnter HCl-Lösung oder KOH-Lösung eingestellt wurde. Es zeigt sich eine deutliche Parallelverschiebung der dem Puffer zugehörigen Messkurve um ganze 2 pH-Einheiten ins Saure. Die ebenfalls zu beobachtende Reduktion der Maximalströme im alkalischen Bereich

liegt im Streubereich des Messverfahrens. Vergleichbare Messungen mit $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ liefern identische Strom-pH-Kurven für beide Elektrolyte, gemäß Abb. 3-29.

Der Effekt der Parallelverschiebung der Kurven in Abbildung 3-28 wird auf die Citronensäure zurückgeführt.

Weil die Citronensäure (pK_a 's: 3.0, 4.4 und 5.8)^[125] azider ist als die Protein-Domäne, lagert sich das Citration bei saurerem pH-Wert an die positivierte Protein-Domäne an und negativiert diese. Demzufolge ist der frühe Anstieg der Stromantwort des $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ auf Induktion durch das Citrat-Anion zurückzuführen (Induktion durch eine elektroinaktive Spezies). Die Differenz der Ströme beider Messkurven in Abbildung 3-28 kann demnach als der Citrat-induzierte Anteil des Redoxstroms interpretiert werden.

Nimmt man an, dass vierfach negativ geladenes $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ eine deutlich größere Affinität zu positiven Protein-Domänen hat als das Citrat-Anion, so wird es trotz geringerer Lösungskonzentration bevorzugt an der Oberfläche akkumuliert und nicht durch das Citrat-Anion verdrängt. Demzufolge wird die Anreicherung und damit die Strom-pH-Kurve des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ nicht beeinträchtigt (Abb. 3-29).

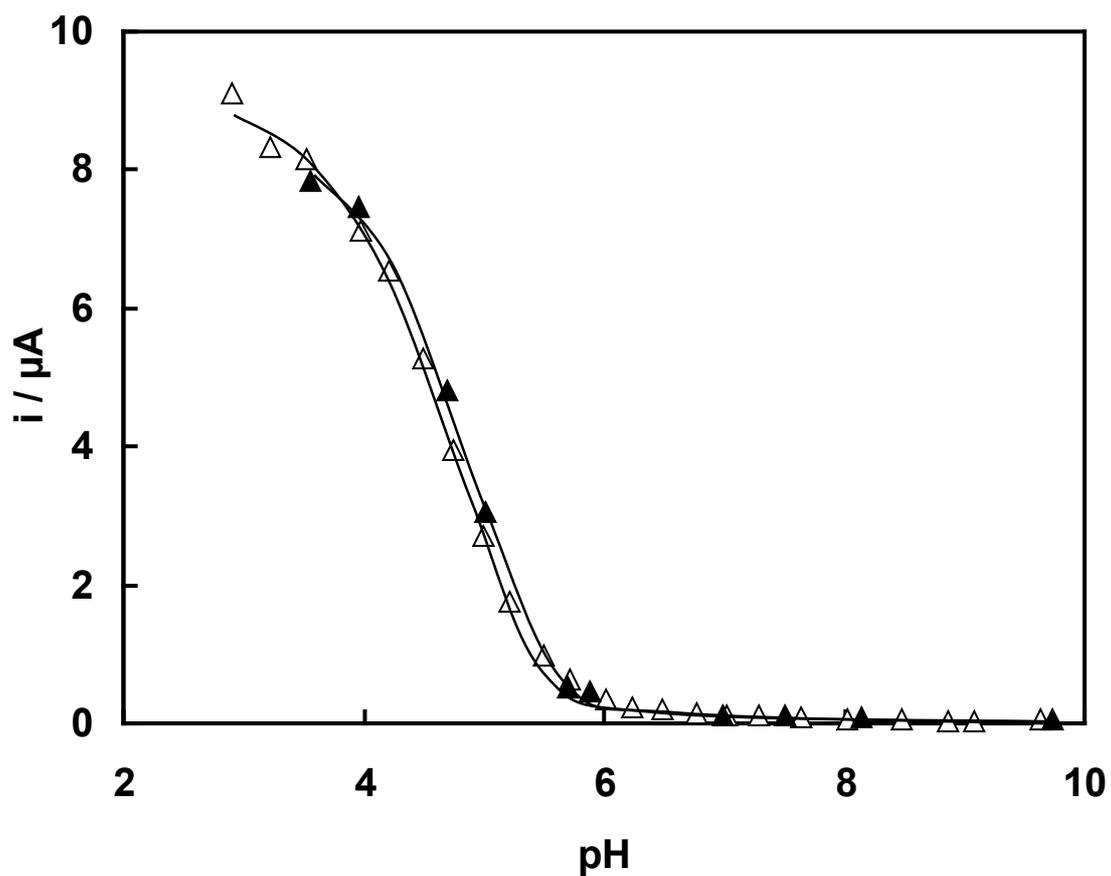


Abb. 3-29: pH-Abhängigkeit der Reduktionsströme von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ an einer Thyroglobulin-modifizierten Gold-Scheibenelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$); weißes Dreieck: 1 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ in 0.1 M KCl; schwarzes Dreieck: 1 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ in Citronensäure / Natriumhydrogenphosphat-Puffer ($c = 0.1 \text{ M}$); der pH-Wert wurde durch Zufügen von 0.1 M HCl oder 0.1 M KOH eingestellt; $v = 5 \text{ mV/s}$, Amplitude: 25 mV

3.7.2 Induktion durch elektroaktive Spezies

3.7.2.1 Viologen 1 induziert $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Ströme

Die Abhängigkeit des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Oxidationsstroms von der Viologen 1 - Konzentration an einer Thyroglobulin-modifizierten Gold-Scheibenelektrode ist in Abb. 3-30 dargestellt.

Bei $\text{pH} = 7.7$ ist unter Abwesenheit von Viologen 1 der Elektronentransfer zum $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ vollständig blockiert. Nach der ersten Addition von Viologen 1 lag dieses $2.5 \mu\text{M}$ in Lösung vor und verursachte einen Stromanstieg auf etwa $2 \mu\text{A}$.

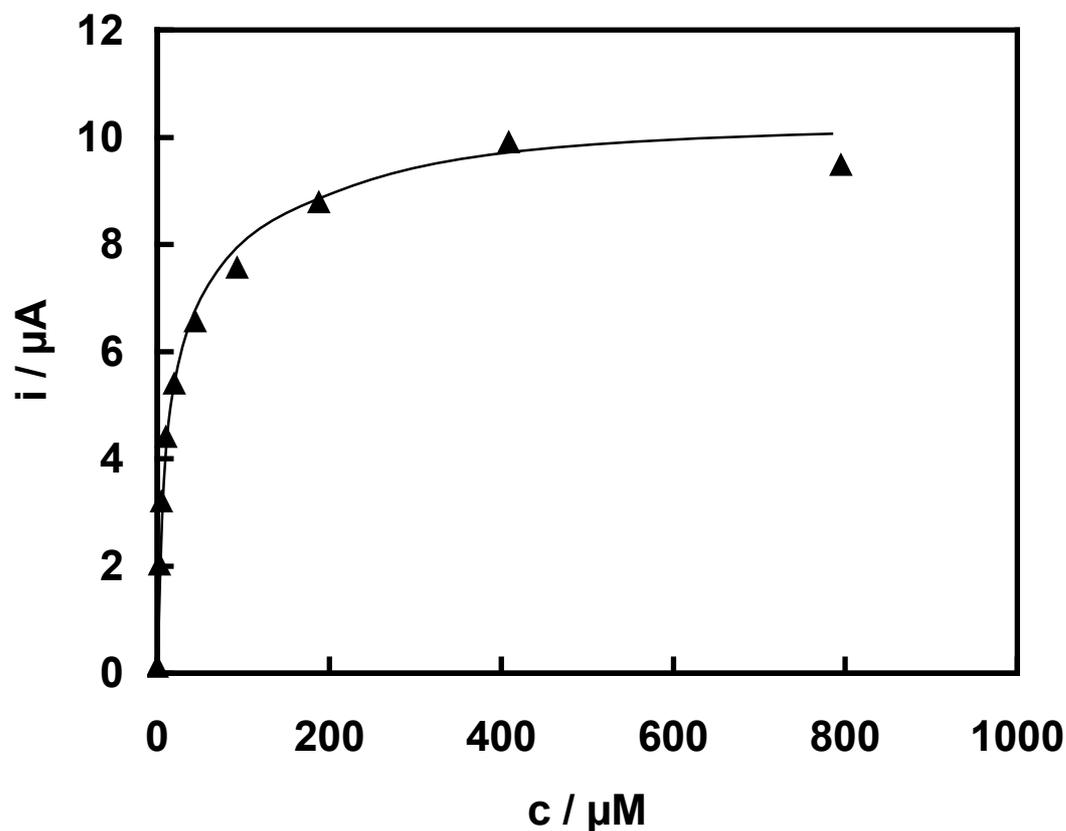


Abb. 3-30: Abhängigkeit des differentiell-pulsvoltametrischen $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Oxidationsstroms an einer Thyroglobulin-modifizierten Elektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$) in 0.1 M KCl von der Viologen 1 -Konzentration in Lösung; $c(\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}) = 1 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7.7$, eingestellt durch Zufügen von 0.1 M KOH , $v = 5 \text{ mV/s}$, Amplitude: 25 mV

Weitere Erhöhung der kationischen Spezies bewirkte zunächst einen raschen Anstieg bis zum halbmaximalen Strom bei $c = 15 \mu\text{M}$. Die folgende schwächere Stromzunahme mit steigender Viologen-Konzentration führte schließlich zu maximalen Strömen bei $c \geq 0.4 \text{ mM}$.

Positiv geladenes Viologen **1** reichert sich analog zum Ca^{2+} auf negativ geladenen Proteindomänen an und polt diese um (Abb. 3-31). $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ akkumuliert in zweiter Sphäre auf dem angereicherten Viologen. Der Elektronentransfer des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ erfolgt nach dem Selbstaustausch-Mechanismus und wächst weiter mit steigender Viologen 1-Konzentration, bis dieses die Sättigung an der Oberfläche erreicht. Die maximalen Viologen 1-induzierten Ströme sind identisch mit den maximalen pH-induzierten Strömen, die sich für $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ an Thyroglobulin-modifizierten Elektroden bei $\text{pH} \leq 3$ beobachten lassen. Vermutlich ist die Konzentration von Viologen **1** bei Sättigung größer als die von Ca^{2+} , so dass größere Oxidationsströme induziert werden.

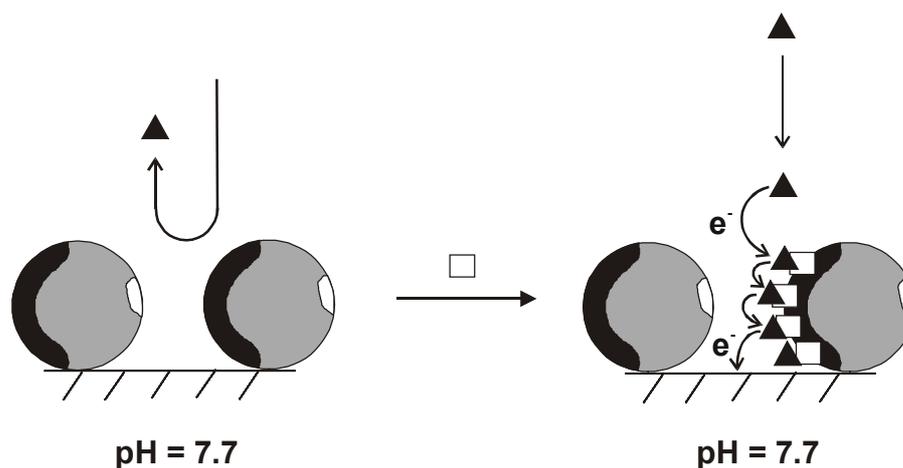


Abb. 3-31: Schematische Darstellung der Induktion des Elektronentransfers von negativ geladenem Hexacyanoferrat (Dreieck) durch die negativ geladene Proteinschicht, bewirkt durch Anreicherung von positiv geladenem Viologen **1** (Quadrat) in negativ geladene Proteindomänen (schwarz), die dadurch umgepolt werden; Hexacyanoferrat akkumuliert sich in zweiter Sphäre auf dem angereicherten Viologen **1**.

3.7.2.2 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ induziert Viologen 1-Ströme

Abbildung 3-32 zeigt die Abhängigkeit des Viologen 1-Reduktionsstroms von der $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Konzentration in Lösung bei $\text{pH} = 2.8$.

Unter diesen Bedingungen ist an der Thyroglobulin-modifizierten Goldelektrode der Elektronentransfer zum Viologen 1 in Lösung blockiert. Zugabe von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ($10 \mu\text{M}$) bewirkte einen kleinen Anstieg des Reduktionsstroms von Viologen 1. Zunehmende $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Konzentration führte zu einem sigmoidalen Anstieg des Reduktionsstroms mit halbmaximalem Wert bei $c = 60 \mu\text{M}$. Ab $c \geq 170 \mu\text{M}$ beobachtete man maximale Ströme.

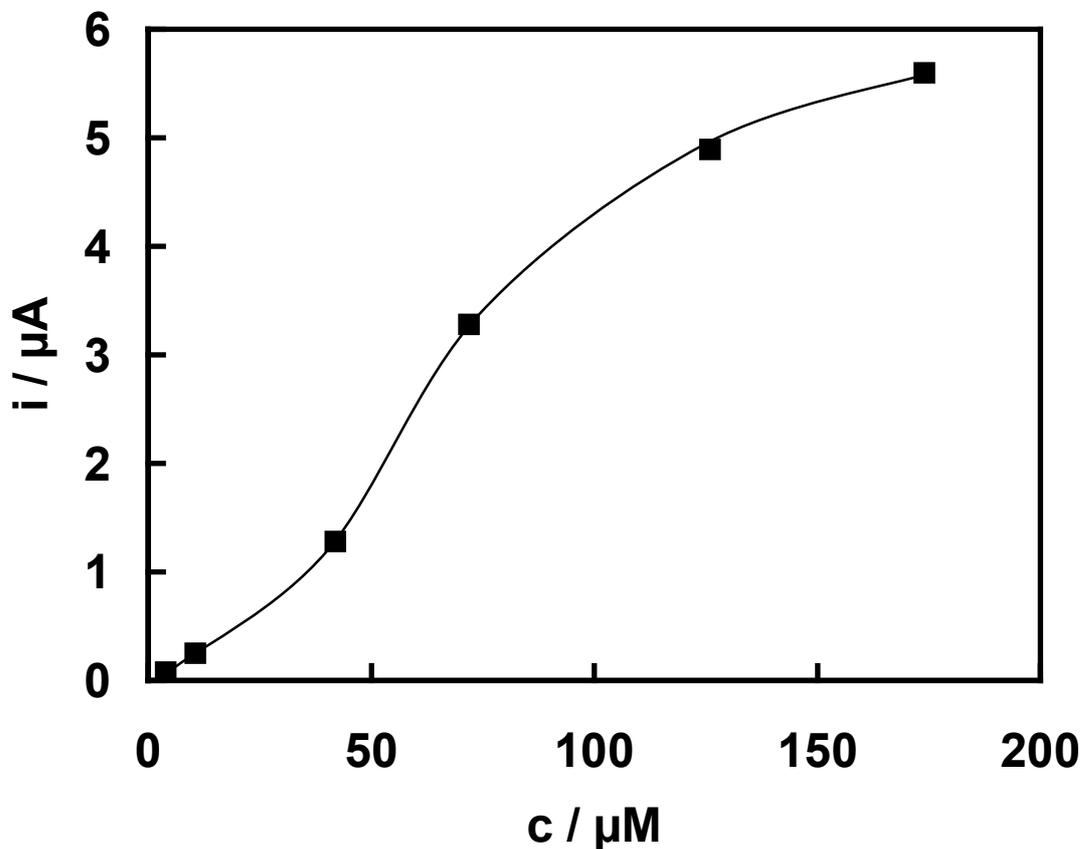


Abb. 3-32: Abhängigkeit des differentiell-pulsvoltametrischen Viologen 1-Reduktionsstroms an einer Thyroglobulin-modifizierten Elektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$) in 0.1 M KCl von der $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Konzentration in Lösung; c (Viologen 1) = 1 mM , $\text{pH} = 2.8$, eingestellt durch Zufügen von 0.1 M HCl ; $v = 5 \text{ mV/s}$, Amplitude: 25 mV

Bei $\text{pH} = 2.8$ ist der Elektronentransfer auf Viologen **1** aufgrund der elektrostatischen Abstoßung durch die Proteinschicht blockiert. Negativ geladenes $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ hingegen reichert sich auf positiv geladenen Protein-Domänen an und polt diese um. Nun kann das Viologen in zweiter Sphäre auf dem akkumulierten $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ in den umgepolten Protein-Domänen adsorbieren. Der Elektronentransfer des Viologens kann jetzt nach dem vorgeschlagenen Selbstaustausch-Mechanismus erfolgen und wächst weiter mit steigender $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Konzentration, bis dieses Sättigung an der Oberfläche erreicht.

Die maximalen $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -induzierten Viologen **1**-Ströme betragen nur etwa die Hälfte der maximalen pH -induzierten Viologen-Ströme. Dies wird auf eine geringere Oberflächenkonzentration des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ bei Sättigung zurückgeführt, als für Viologen **1** im vorausgehenden Induktions-Experiment. Demnach ist die Effizienz des Umpolens geringer und damit auch die Oberflächenkonzentration des in zweiter Sphäre angereicherten $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. Folglich nimmt der Reduktionsstrom nicht absolut maximale Werte an (wie an blanken Elektroden).

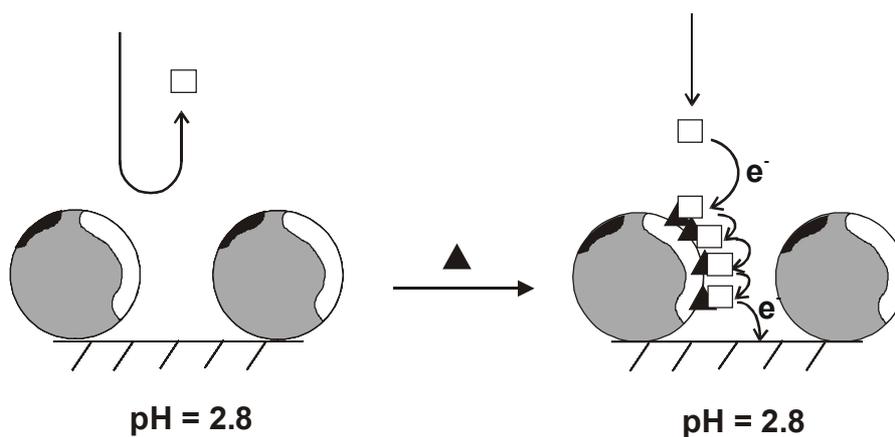


Abb. 3-33: Schematische Darstellung der Induktion des Elektronentransfers von positiv geladenem Viologen **1** (Quadrat) durch die positiv geladene Proteinschicht bewirkt durch Anreicherung von negativ geladenem Hexacyanoferrat (Dreieck) in positiv geladene Proteindomänen (weiß), die dadurch umgepolt werden; Viologen **1** akkumuliert sich in zweiter Sphäre auf dem angereicherten Hexacyanoferrat.

3.7.3 Gegenseitige Induktion der Viologen 1- und $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Ströme

Es wurden DPV-Messungen in Gegenwart von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ und Viologen 1 in gleichen Konzentrationen in 0.1 M KCl durchgeführt. Eine erniedrigte Konzentration von 0.2 mM wurde gewählt, um die Bildung eines Niederschlags zu vermeiden. Man erhielt die in Abb. 3-34 gezeigten Strom-pH-Abhängigkeiten.

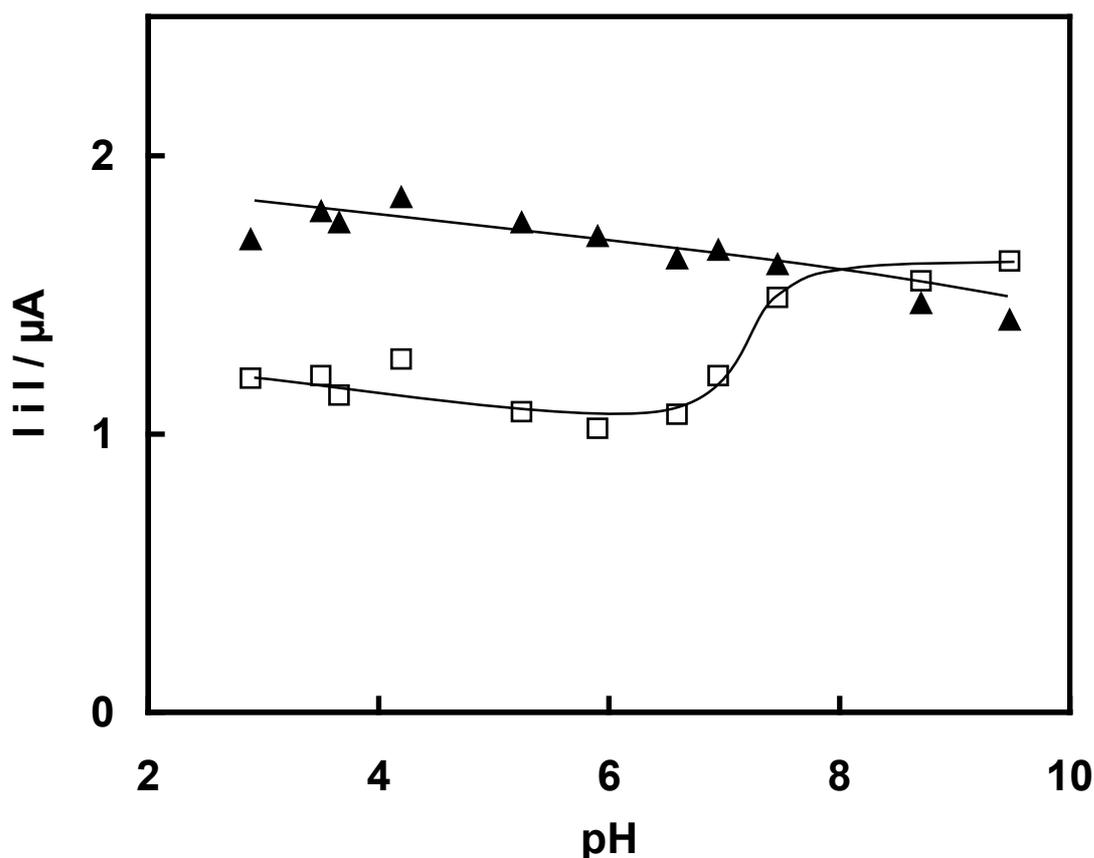


Abb. 3-34: Abhängigkeiten der Redoxströme von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (Dreieck) und Viologen 1 (Quadrat) als Funktion des pH-Wertes an einer Thyroglobulin-modifizierten Goldelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$) in 0.1 M KCl; c (Redoxmarker) = 0.2 mM; der pH-Wert der ungepufferten Lösung wurde eingestellt durch Zufügen von 0.1 M HCl; $v = 5 \text{ mV/s}$, Amplitude: 25 mV.

Der Oxidationsstrom des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ist über den gesamten pH-Bereich konstant, mit Ausnahme der leichten Abnahme in Richtung alkalischer pH-Werte, die jedoch auch tendenziell an blanken Goldelektroden beobachtet wird und daher nicht auf die Elektrodenmodifikation oder das Viologen 1 zurückgeführt wird. Offensichtlich ist der

Viologenstrom bei $\text{pH} \leq 7$ gegenüber dem $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Strom deutlich reduziert, steigt aber bei $\text{pH} \geq 7$ auf vergleichbare Werte an.

Im sauren pH-Bereich sind die $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Ströme *pH-induziert*, die Viologen-Ströme hingegen *$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -induziert*. Daher sind die Viologenströme im Vergleich zu den $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Strömen vermindert, gemäß Kapitel 3.7.2.2. Bei $\text{pH} = 7$ findet ein mechanistischer Wechsel der Induktion statt. Oberhalb $\text{pH} = 7$ sind die Viologenströme *pH-induziert* und wachsen auf maximale Werte an. Die $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Ströme werden durch das *Viologen induziert* und bleiben maximal, gemäß Kapitel 3.7.2.1 (Abb. 3-35).

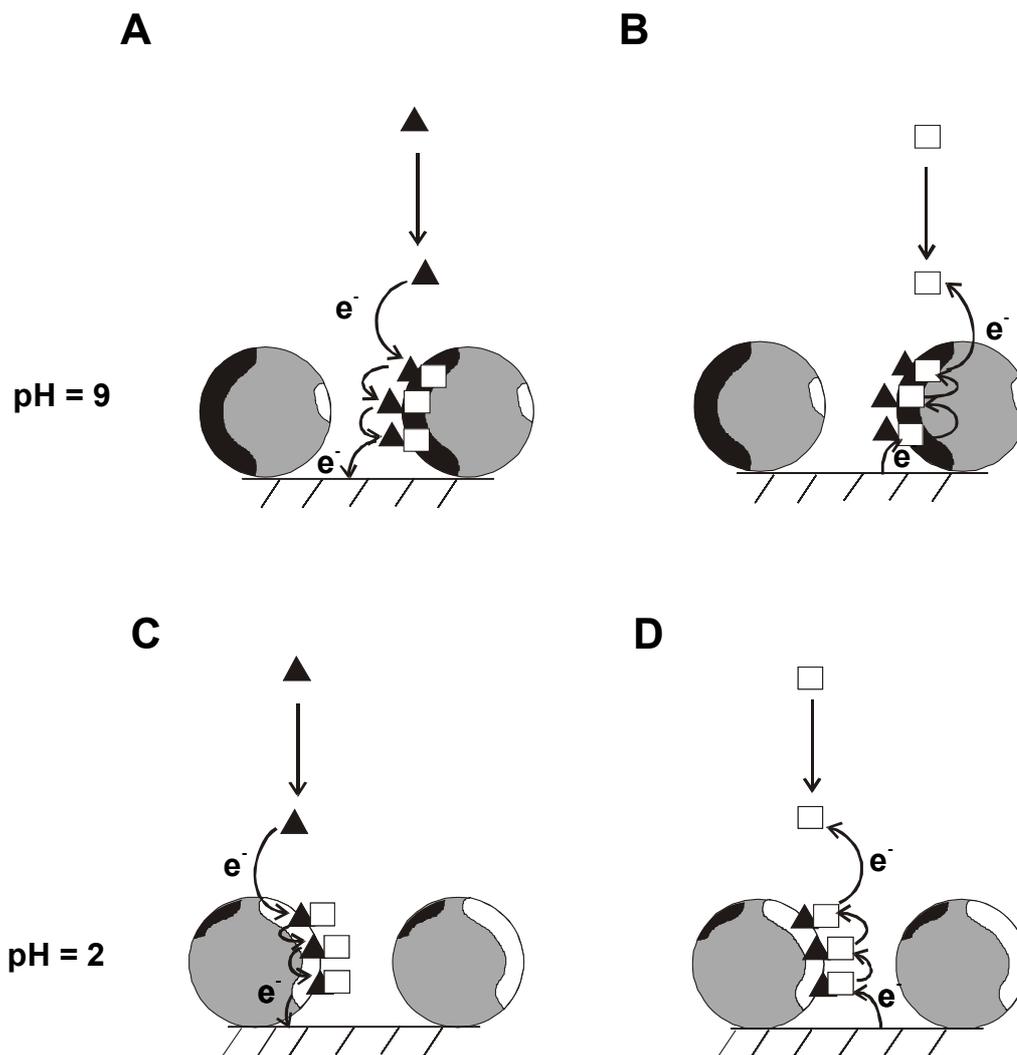


Abb. 3-35: Modellhafte Veranschaulichung der gegenseitigen Induktion: Elektronentransfer von negativ geladenem Hexacyanoferrat (schwarzes Dreieck) und positiv geladenem Viologen 1 (weiße Quadrat), Austausch der Akkumulationssphären beim Übergang von sauren zu alkalischen pH-Werten;

Ströme fließen in 2 parallelen Austauschketten: Viologen-Reduktionsströme in reduktiver, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ in oxidativer Elektronentransferkette; A: Viologen-induzierter $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Oxidationsstrom; B: pH-induzierter Viologen-Reduktionsstrom; C: pH-induzierter $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Oxidationsstrom; D: $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -induzierter Viologen-Reduktionsstrom.

3.7.4 Suppression des induzierten Elektronentransfers

Der $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Oxidationsstrom wird bei $\text{pH} = 7.7$ mit zunehmender Konzentration von Viologen **1** an der Protein-modifizierten Elektrode induziert. Zufügen von elektroinaktivem Naphthalintrisulfonat führt zur Abnahme des induzierten Oxidationsstromes, gemäß Abb. 3-36.

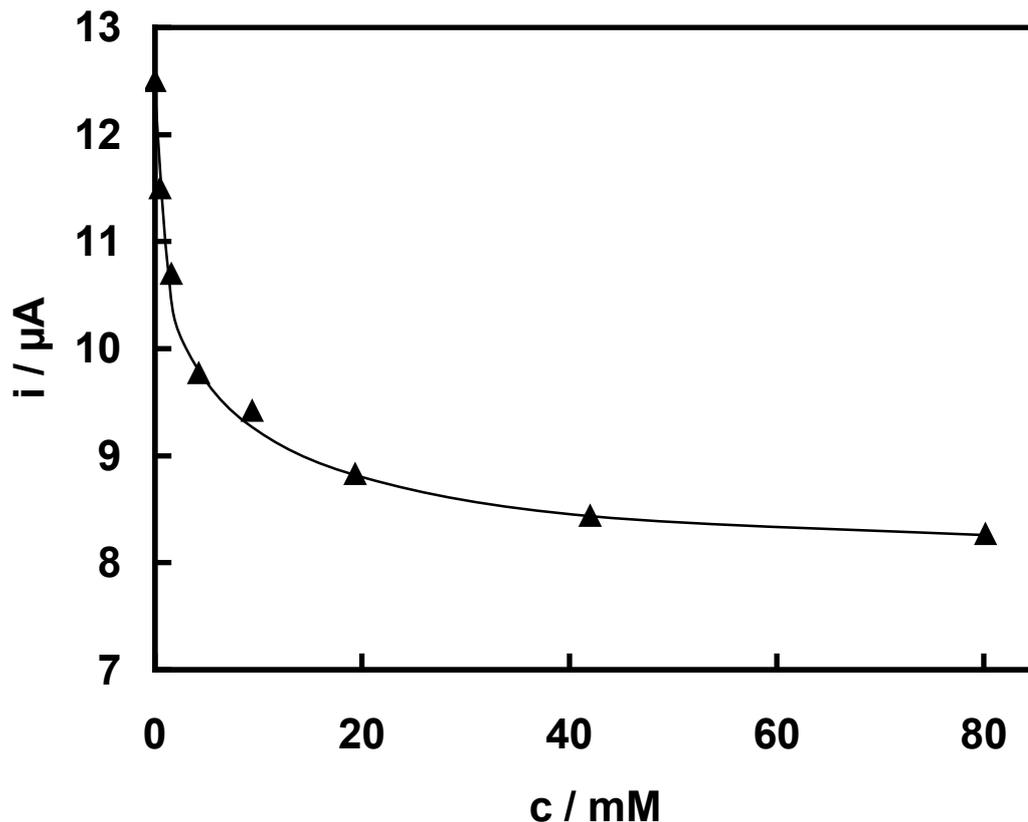


Abb. 3-36: Oxidationsstrom von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ an einer Thyroglobulin-modifizierten Goldelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$) in 0.1 M KCl mit steigender Konzentration von Naphthalintrisulfonat, in Gegenwart von 0.4 mM Viologen **1**, $c(\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}) = 1 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7.7$; der pH -Wert wurde eingestellt durch Zufügen von 0.1 KOH ; $v = 5 \text{ mV/s}$, Amplitude: 25 mV .

Die Messungen wurden in Gegenwart von 0.4 mM Viologen **1** durchgeführt, um maximale Redoxströme zu induzieren. Bei einer Konzentration von etwa 4 mM Naphthalintrisulfonat ist der Oxidationsstrom des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ um nahezu ein Drittel des Ausgangswerts reduziert und wird mit ansteigender Naphthalintrisulfonat-Konzentration weiter unterdrückt, um bei Konzentration $c > 60 \text{ mM}$ einen Endwert anzunehmen, der etwa ein Drittel des

Ausgangswerts entspricht. An einer blanken Goldelektrode zeigt sich kein Einfluss des Naphthalintrisulfonats, der Oxidationsstrom bleibt unverändert.

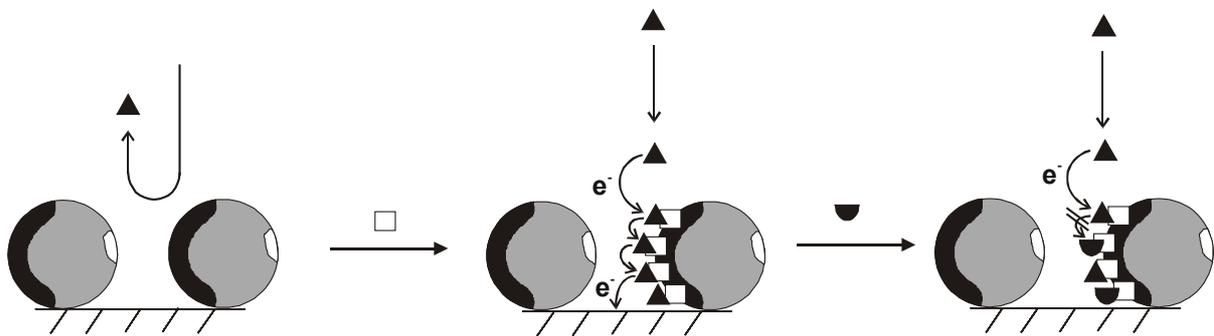


Abb. 3-37: Schematische Darstellung der Suppression des Viologen 1 (Quadrat)-induzierten Elektronentransfers von Hexacyanoferrat (Dreieck) an einer negativ geladenen Proteinschicht, durch Konkurrenz und Verdrängung mit Naphthalintrisulfonat (Halbkreis) als negativ geladene, elektroinaktive Spezies, Zusammenbruch der Selbsttausch-Kette, Unterdrückung des Elektronentransfers

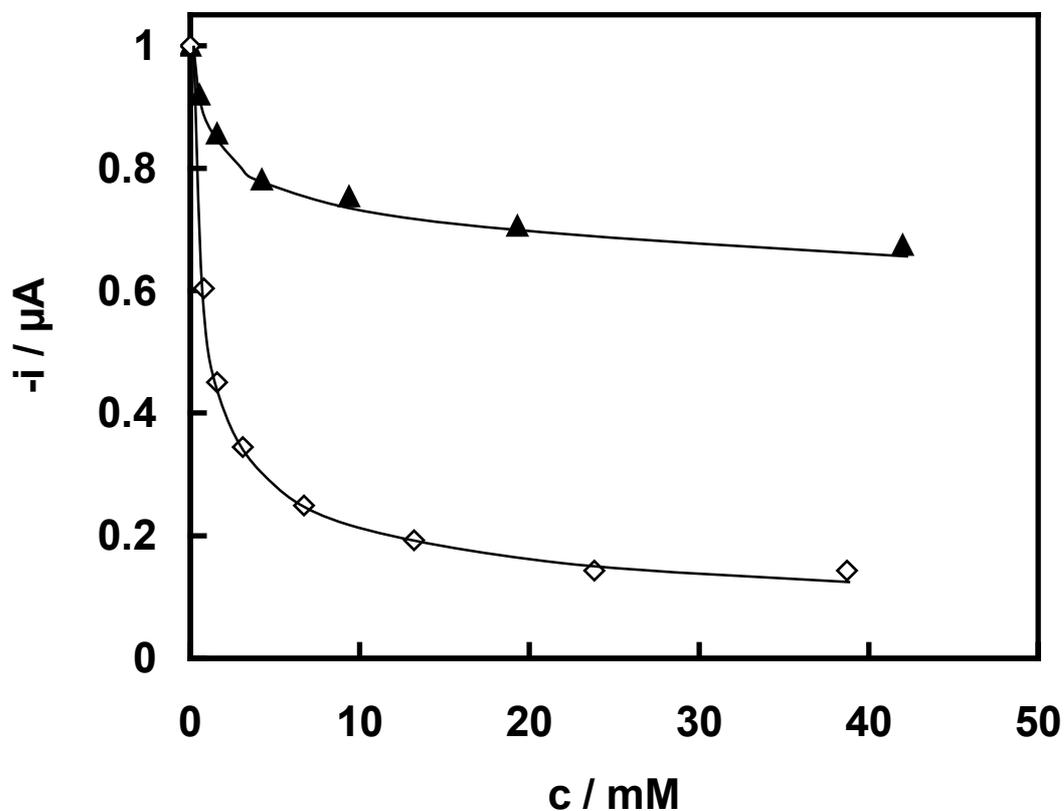


Abb. 3-38: Vergleich der Suppressions-Effizienz: Abhängigkeit der normierten $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Oxidationsströme von der Naphthalintrisulfonat-Konzentration; Raute: *pH-induzierter* Oxidationsstrom; Dreieck: *Viologen-induzierter* Oxidationsstrom; $v = 5 \text{ mV/s}$, Amplitude: 25 mV

Die Effizienz der Suppression des *Viologen-induzierten* $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Oxidationsstroms ist gegenüber der Suppression des *pH-induzierten* $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Oxidationsstroms (Abb. 3-38) deutlich verringert. Das $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ bindet deutlich stärker in zweiter Sphäre an das oberflächenakkumulierte Viologen **1** bei alkalischem pH-Wert als das Naphthalintrisulfonat. Hingegen bindet bei sauren pH-Werten das Naphthalintrisulfonat besser an positiv geladene Protein-Domänen und verdrängt $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ in deutlich größerem Maße von der Oberfläche, so dass die Ströme entsprechend stärker vermindert werden.

3.8 Katalytischer Elektronentransfer durch eine Proteinschicht

Wie bereits in Kapitel 3.5 formuliert, sollte es nach dem postulierten Modell des Elektronentransfers möglich sein, über die Elektronentransferkette ein *anderes* Redoxsystem in Lösung anzukoppeln (Elektrokatalyse). Konkret wurde der $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ -Oxidationsstrom an der Thyroglobulin-modifizierten Goldelektrode, als Funktion der Konzentration von Viologen **2** bei $\text{pH} = 10.3$, untersucht. Bei diesem pH-Wert ist $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ selbst elektroinaktiv an der Protein-modifizierten Elektrode.

Der Nachweis der elektrokatalytischen Reduktion des Hexacyanoferrat(III) durch Viologen **2** wird im Folgenden erläutert.

Aufgrund der komplexen beobachteten Phänomene wird die gesamte Messung in einer Folge von 5 Abbildungen (3-39 bis 3-43) dargestellt. In jeder Abbildung sind die Cyclovoltammogramme von 3 aufeinanderfolgenden Konzentrations-Messpunkten überlagert. Der besseren Übersicht halber wird das jeweils der höchsten Konzentration zugehörige Cyclovoltammogramm auch in die darauffolgende Abbildung übernommen und repräsentiert dort den niedrigsten Konzentrationswert der Messfolge.

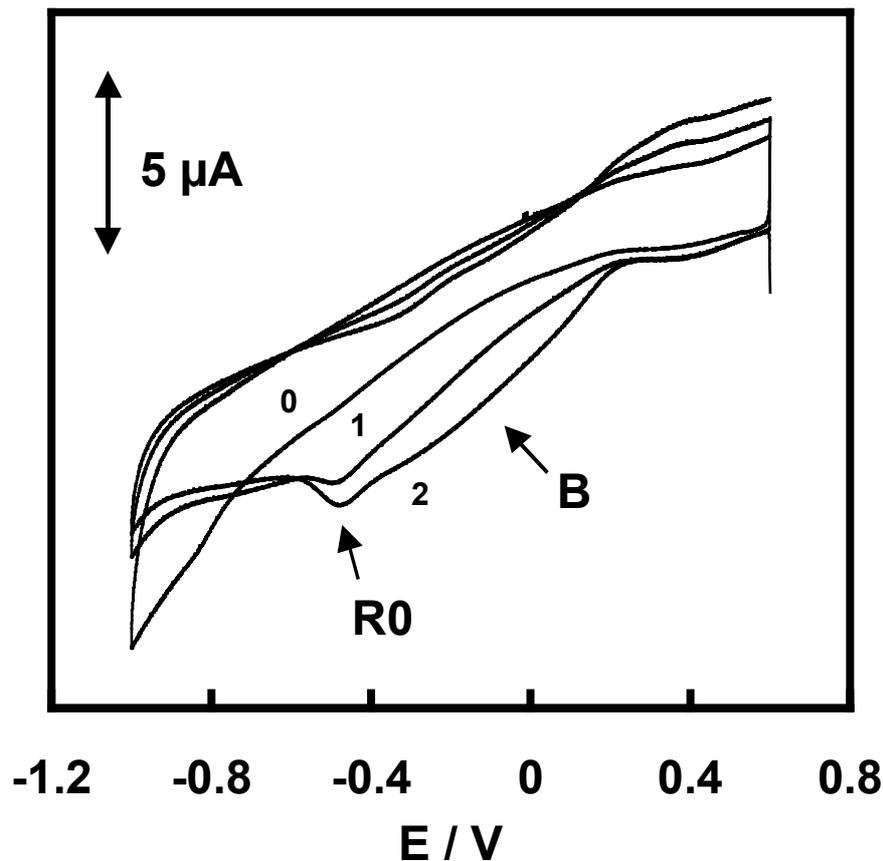


Abb. 3-39: Übereinandergelagerte Cyclovoltammogramme von $1 \text{ mM Fe(CN)}_6^{3-}$ in 0.1 M KCl bei $\text{pH} = 10.3$ (eingestellt mit verd. KOH) in Gegenwart von $0, 1$ und $2 \mu\text{M}$ Viologen 2 an Thyroglobulin-modifizierter Gold-Scheibenelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$), $\nu = 0.1 \text{ V/s}$

In Abwesenheit von Viologen 2 wird eine effiziente Unterdrückung des Elektronentransfers des Fe(CN)_6^{3-} beobachtet. Bereits nach erster Zugabe von Viologen 2 ($c = 1 \mu\text{M}$) tritt bei -475 mV ein definierter Reduktionspeak R_0 in der Gegend der Viologen-Reduktion auf. Der zugehörige Peakstrom wächst mit Verdopplung der Viologen-Konzentration ($c = 2 \mu\text{M}$) weiter an (Abb. 3-39).

Interessanterweise bewirkt die darauffolgende Konzentrationserhöhung ($c = 6 \mu\text{M}$) (siehe Abb. 3-40) eine signifikante Verminderung des Peakstromes von R_0 und es ist ein weiterer

Reduktionspeak R1 bei -711 mV zu beobachten. Währenddessen wächst der direkte Reduktionsstrom des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ kontinuierlich mit steigender Viologen-Konzentration und äußert sich zunächst in einem wachsenden, sehr breiten kathodischen „Bauch“ (B).

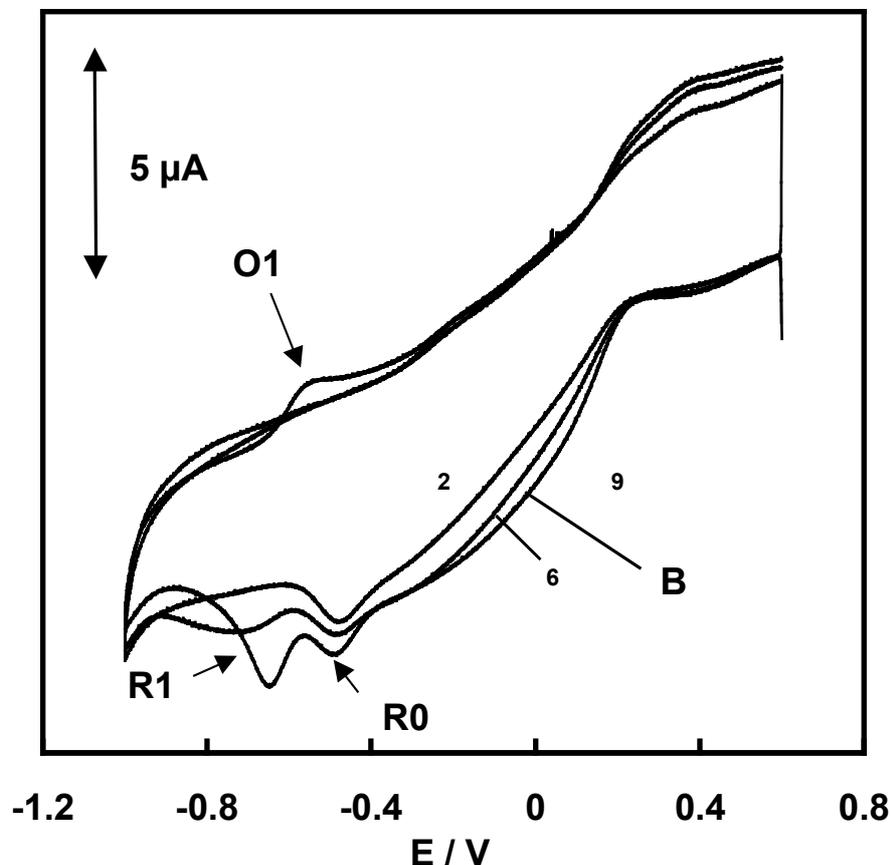


Abb. 3-40: Überinandergelagerte Cyclovoltammogramme von 1 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ in 0.1 M KCl bei pH = 10.3 (eingestellt mit verd. KOH) in Gegenwart von 2, 6 und 9 μM Viologen 2 an Thyroglobulin-modifizierter Gold-Scheibenelektrode ($A = 0.07$ cm²); $v = 0.1$ V/s

In anodischer Richtung treten bis zu dieser Viologen-Konzentration ($c = 6$ μM) keine Peaks im negativen Potentialbereich auf. Das ist ein Hinweis auf die elektrokatalytische Natur der *kathodischen* Peakströme. Bei positiven Potentialen ist der Anstieg des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Oxidationsstromes zu beobachten. Dieser wird der direkten elektrochemischen Oxidation der Redoxspezies zugeordnet. Die anschließende Konzentrationserhöhung ($c = 9$ μM) bewirkt eine deutliche Verschiebung des Peakpotentials von R1 um ca. +60 mV in positiver Richtung. Desweiteren verdreifacht sich der zugehörige Peakstrom von R1. In anodischer Richtung wird erstmals ein Oxidationspeak O1 bei -556 mV beobachtet. Bei $c = 13$ μM (siehe Abb. 3-41) ist eine deutliche Abnahme vom Reduktionspeak R0 zu beobachten, während weitere Verschiebung des Peakpotentials von R1 um +30 mV in positiver

Potentialrichtung festzustellen ist. Der korrespondierende Peakstrom hat um ca. 50 % zugenommen. Ein minimales Anwachsen des Oxidationspeaks O1 ist ebenfalls zu verzeichnen, der außerdem ein um + 30 mV positiveres Peakpotential als zuvor aufweist. Die folgende Verdopplung der Viologenkonzentration ($c = 26 \mu\text{M}$) hat zur Folge, dass der Reduktionspeak R0 nahezu verschwindet, während R1 abermals um + 40 mV ins Positive wandert und der Peakstrom leicht zunimmt.

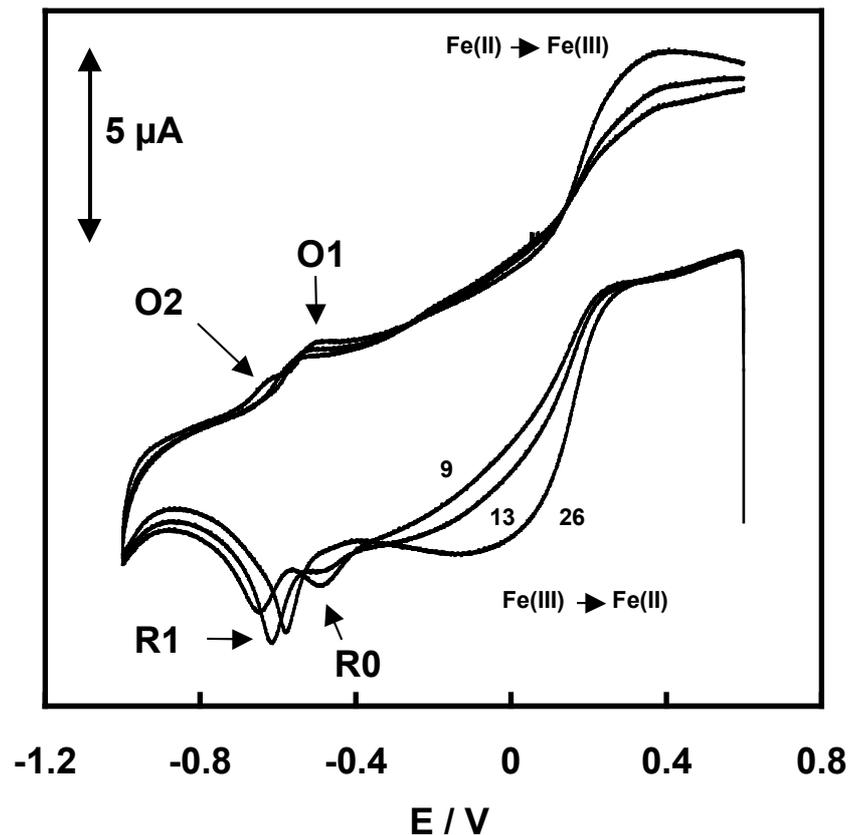


Abb. 3-41: Übereinandergelagerte Cyclovoltammogramme von 1 mM Fe(CN)_6^{3-} in 0.1 M KCl bei pH = 10.3 (eingestellt mit verd. KOH) in Gegenwart von 9, 13 und 26 μM Viologen 2 an Thyroglobulin-modifizierter Gold-Scheibenelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$); $\nu = 0.1 \text{ V/s}$

Es tritt erstmals ein zweiter Oxidationspeak O2 bei negativerem Potential von $E = -638$ mV auf, gleichzeitig wird der Oxidationspeak O1 weiter ins Positive verschoben und der Peakstrom nimmt leicht ab.

Die darauffolgende Viologen-Zugabe ($c = 54 \mu\text{M}$) bewirkt eine weitere Verschiebung von R1 um $+25$ mV, der Strom nimmt leicht ab. Ein weiterer, dritter Reduktionspeak R2 zeigt sich in der Schulter von R1 bei -640 mV. Die anodischen Peaks O1 und O2 sind beide um ca. $+20$ mV verschoben. Der Peakstrom von O2 hat sich etwa verdoppelt, während der von O1 um ca. 30 % vermindert wurde.

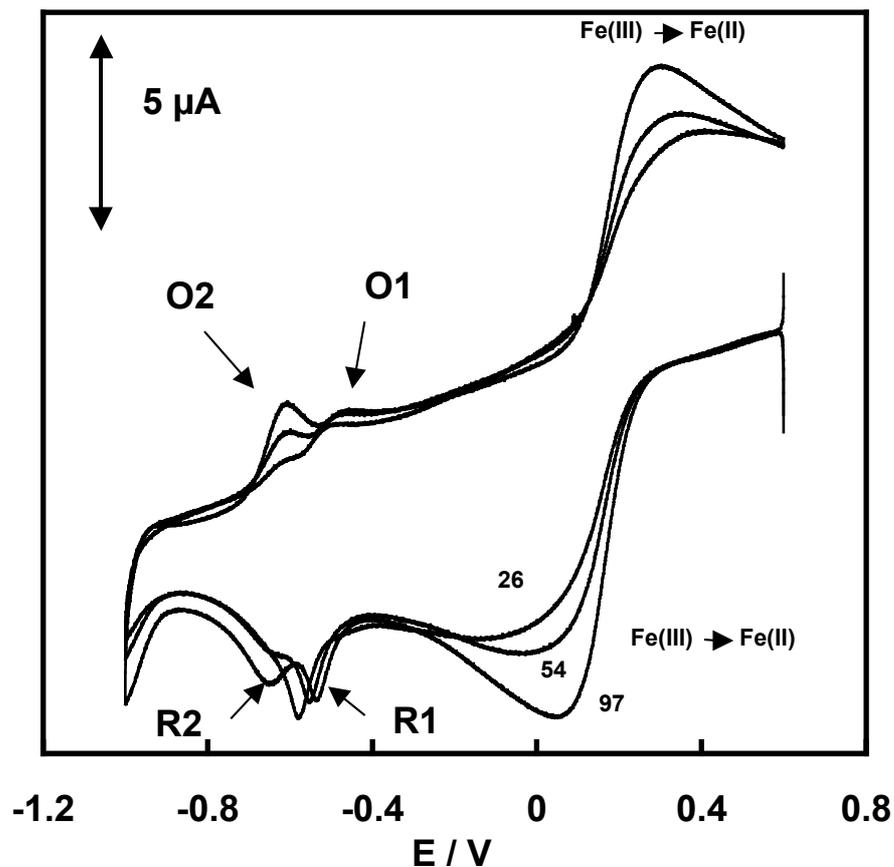


Abb. 3-42: Übereinandergelagerte Cyclovoltammogramme von $1 \text{ mM Fe(CN)}_6^{3-}$ in 0.1 M KCl bei $\text{pH} = 10.3$ (eingestellt mit verd. KOH) in Gegenwart von 26 , 54 und $97 \mu\text{M}$ Viologen 2 an Thyroglobulin-modifizierter Gold-Scheibenelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$); $v = 0.1 \text{ V/s}$

Im Folgenden bewirken die weiteren Konzentrationserhöhungen das gleichmäßige Anwachsen sowohl von Reduktionspeak R2 als auch Oxidationspeak O2, die der direkten elektrochemischen Reduktion bzw. Oxidation von Viologen 2 zugeordnet werden. Gleichmaßen werden sowohl der Reduktionspeak R1, als auch der Oxidationspeak O1 vermindert. Verschiebungen der Peakpotentiale sind nicht mehr zu beobachten. Am Ende der Messreihe ist der Oxidationspeak O1 vollständig verschwunden, während der kathodische Peak R1 deutlich vermindert beobachtet wird (Abb. 3-43).

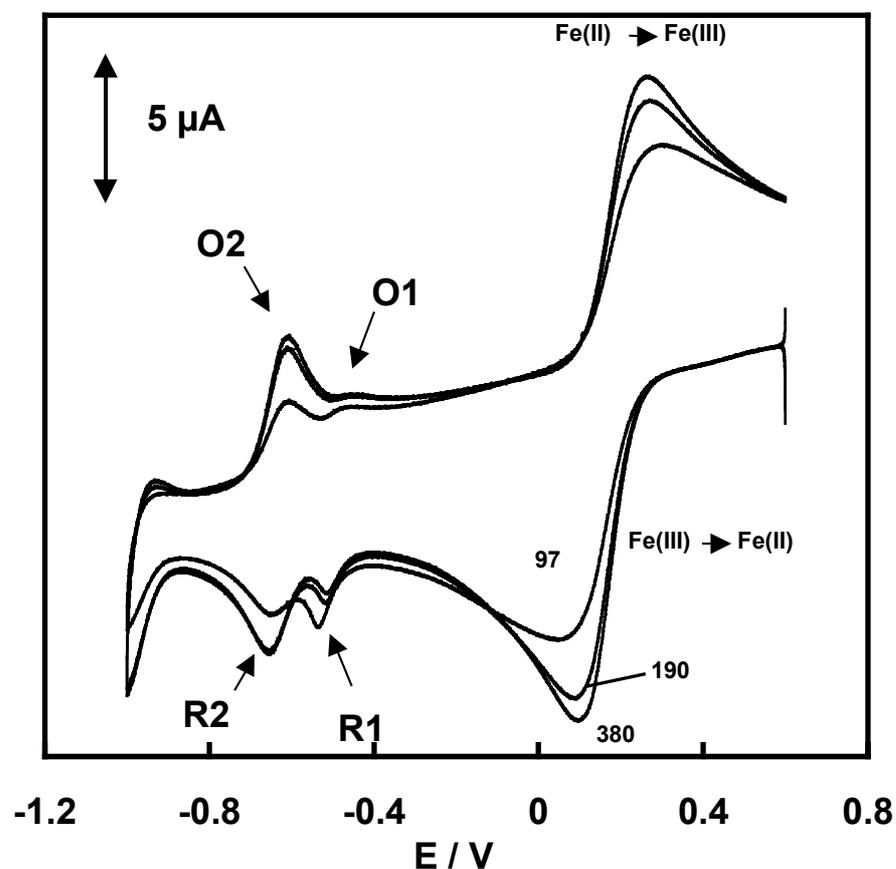


Abb. 3-43: Übereinandergelagerte Cyclovoltammogramme von $1 \text{ mM Fe(CN)}_6^{3-}$ in 0.1 M KCl bei $\text{pH}=10.3$ (eingestellt mit verd. KOH) in Gegenwart von 97 , 190 und $380 \mu\text{M}$ Viologen 2 an Thyroglobulin-modifizierter Gold-Scheibenelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$); $\nu = 0.1 \text{ V/s}$

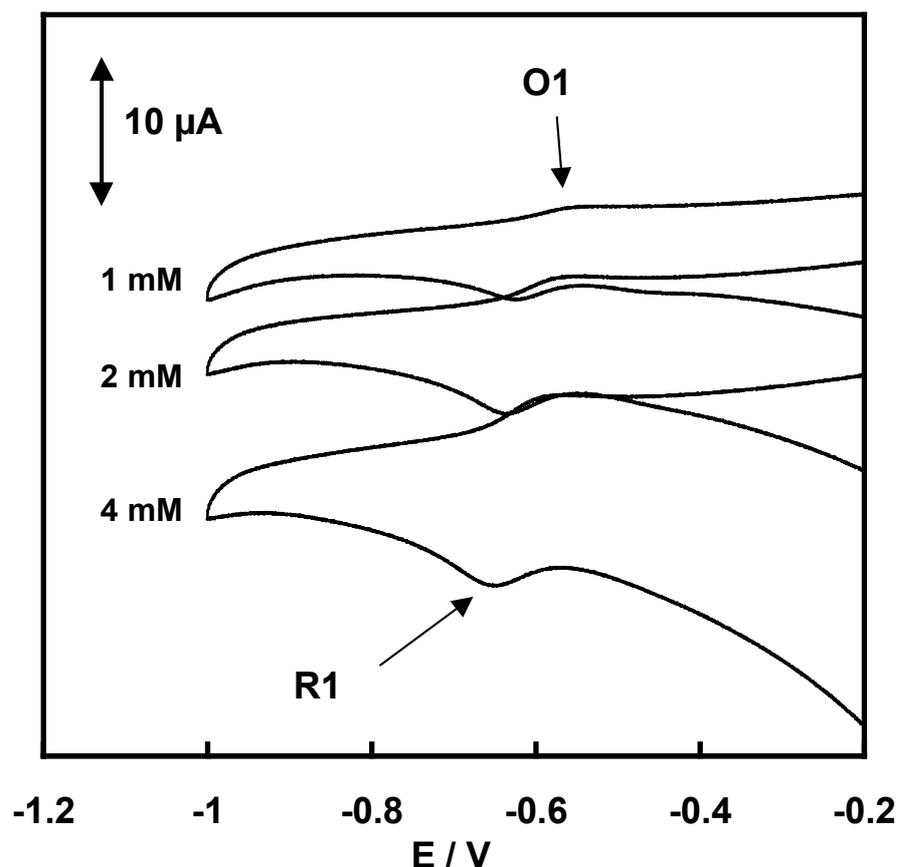


Abb. 3-44: Übereinandergelagerte Cyclovoltammogramme von 1, 2 und 4 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ in 0.1 M KCl bei $\text{pH} = 10.3$ (eingestellt mit verd. KOH) in Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ Viologen 2 an Thyroglobulin-modifizierter Gold-Scheibenelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$); $\nu = 0.1 \text{ V/s}$

In einem weiteren Experiment wurde bei konstanter Viologen- die $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ -Konzentration erhöht. Verdopplung der $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ -Konzentration bewirkte einen signifikanten Zuwachs des Stromes von Peak R1 um etwa 50 %, weitere $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ -Verdopplung verursachte erneute Zunahme um etwa 25 % (Abb. 3-44). Da die Viologen-Konzentration konstant war, deutet die wurzelabhängige Zunahme des Stromes auf elektrokatalytische Reduktion des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ durch reduziertes Viologen 2 hin. Interessanterweise nahm der Oxidationsstrom gleichsinnig zu, war jedoch in jedem Fall gegenüber dem Reduktionsstrom deutlich vermindert. Dies ist ebenfalls ein Hinweis auf Elektrokatalyse.

$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ist an der Thyroglobulin-modifizierten Elektrode bei $\text{pH} = 10.3$ elektroinaktiv. Ein Elektronentransfer auf das $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ kann elektrokatalytisch erfolgen. Die Elektronen fließen

von der Goldelektrode zum oberflächenakkumulierten Viologen **2** und werden dann von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ in Lösung aufgenommen. Demnach ist die Reduktion des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ chemischer Natur, sie läuft gemäss der elektrochemischer Spannungsreihe derart ab, dass die an der Elektrodenoberfläche generierte reduzierte Form des einen Halbelements – in diesem Falle reduziertes Viologen – die oxidierte Form des anderen Halbelements mit größerem Normalpotential – in diesem Falle $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ – reduziert. Dies ist gleichbedeutend mit der Oxidation des Viologenradikalkations zur Ausgangsverbindung, so dass Viologen für einen weiteren Katalysezyklus zur Verfügung steht (Abb. 3-45).

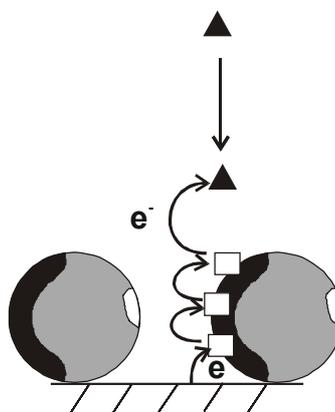


Abb. 3-45: Schematische Darstellung des katalytischen Reduktionsstroms: angereichertes, elektrochemisch reduziertes Viologen **2** reduziert $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ in Lösung

Elektrokatalytische Ströme wurden kürzlich von Barton et al.^[126, 127] an DNA-modifizierten Elektroden beobachtet. Methylenblau interkalierte in doppelsträngige DNA und katalysierte die Reduktion von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ in Lösung. Mit diesem Verfahren war es den Autoren ebenfalls möglich, Fehlbasenpaarungen zu detektieren. Diese bewirkten, dass Methylenblau weniger gut bis garnicht interkalierte, so dass die elektrokatalytischen Ströme abnahmen.

3.9 Kovalente Immobilisierung eines Proteins

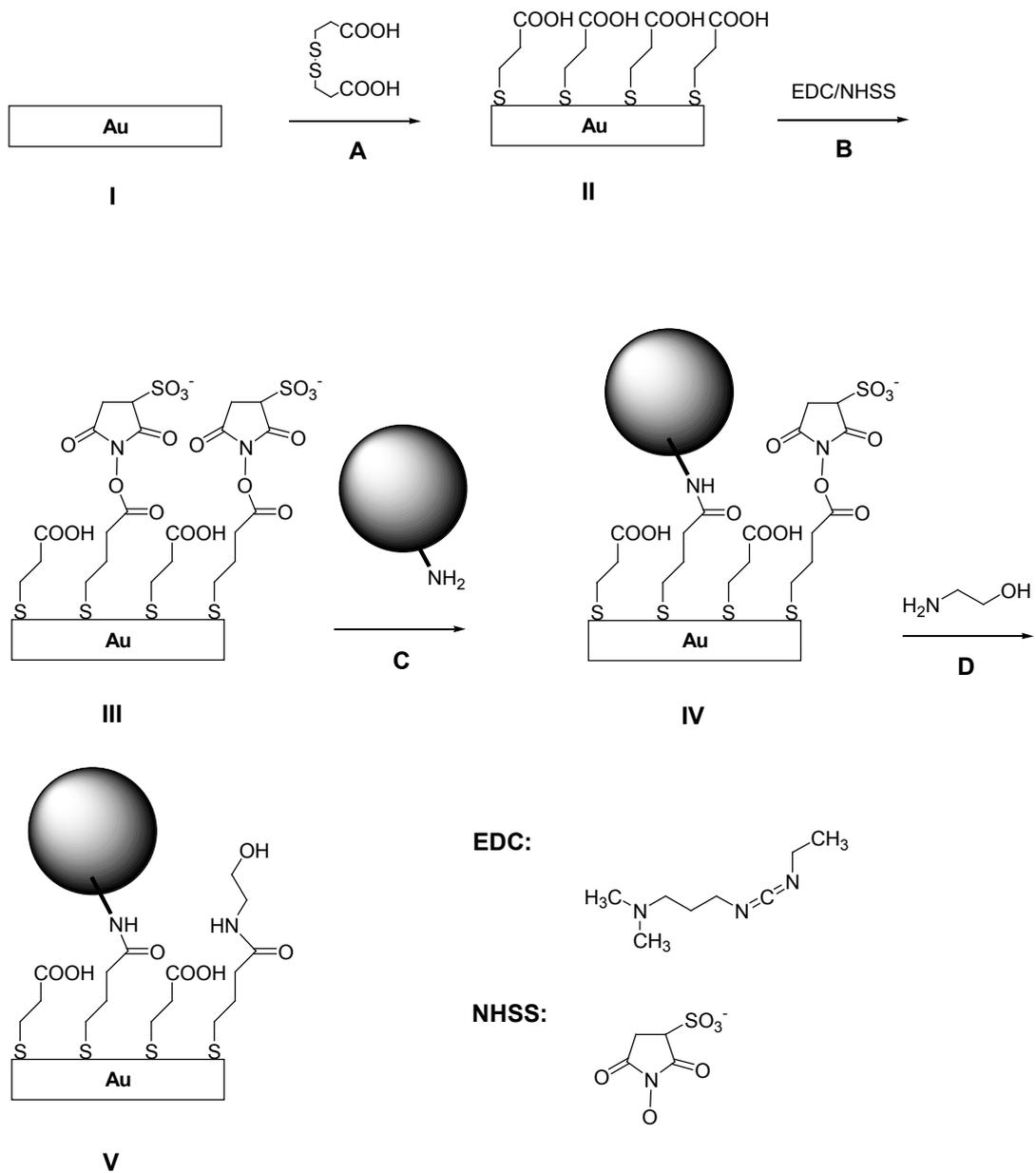


Abb. 3-46: Immobilisierung eines Proteins mittels EDC / NHSS-Kupplung; A: Bildung eines SAMs der Dithiodipropionsäure; B: Aktivierung zu NHSS-Funktionen; C: Kupplung des Proteins an aktivierte NHSS-Funktionen; D: Quenching der überschüssigen aktivierten NHSS-Funktionen

Proteine können durch kovalente Kupplung mit aktivierten Funktionen auf einer modifizierten Substratoberfläche immobilisiert werden. Eine häufig angewandte Technik ist die Carbodiimid-Kupplung, welche die Verknüpfung von Aminen mit Carbonsäuren in wässrigen Lösungen unter physiologischen Bedingungen ermöglicht. [25, 128, 111]

Durch Selbstassemblierung von Dithiodipropionsäure auf Gold ist das Substrat mit Carboxylgruppen funktionalisiert, die im nächsten Schritt mit einem Gemisch aus Sulfo-N-Hydroxysuccinimid (NHSS) und N-Ethyl-N-[dimethylaminopropyl]carbodiimid (EDC) in NHSS-Funktionen konvertiert (B) werden. Damit ist die Oberfläche gegenüber dem nukleophilen Angriff von zugänglichen primären Aminofunktionen des zu immobilisierenden Proteins (C) aktiviert. Überschüssige NHSS-Funktionen werden nach kovalenter Kupplung des Proteins mit Ethanolamin umgesetzt und so in inerte Amidfunktionen überführt (D).

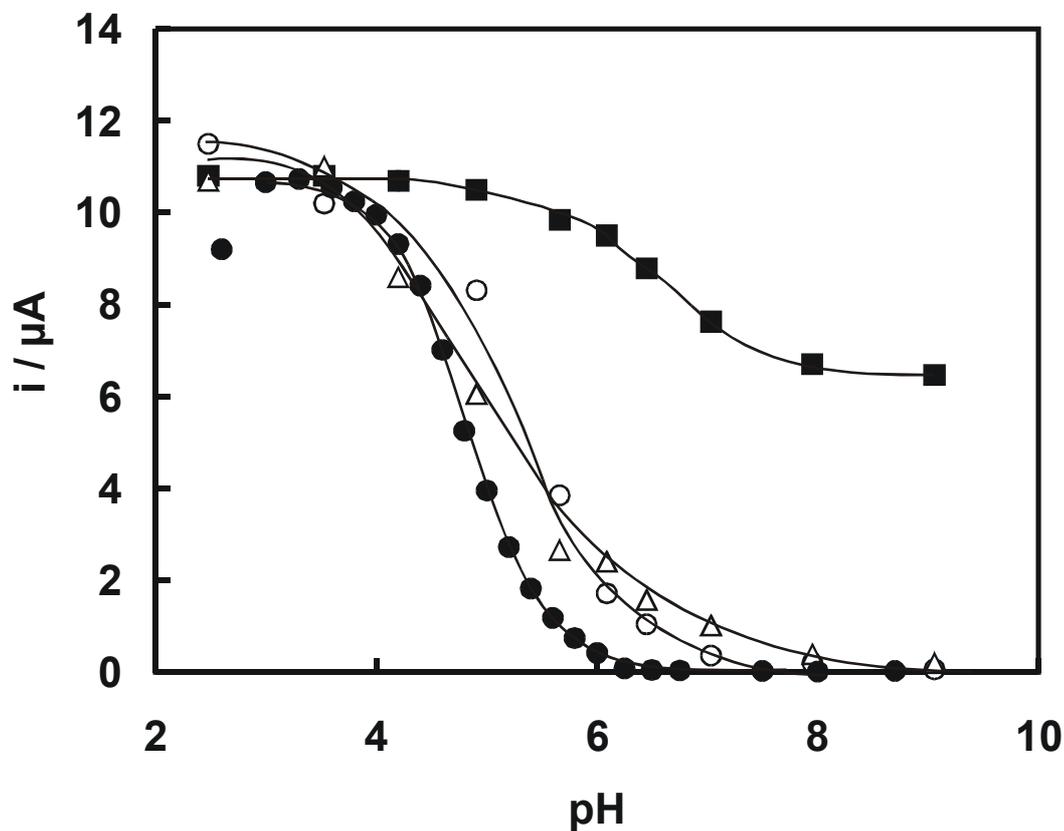


Abb. 3-47: pH-Abhängigkeit der Oxidationsströme von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ an modifizierten Gold-Scheibenelektroden ($A = 0.07 \text{ cm}^2$) in 0.1 M KCl; SAM von Mercaptopropionsäure (Dreieck); kovalent immobilisierte Aldolase (weißer Kreis); aktivierte und direkt gequenchte Oberfläche (ohne Proteinschicht) (Quadrat); unspezifisch adsorbierte Aldolase (schwarzer Kreis); $v = 5 \text{ mV/s}$, Amplitude: 25 mV

Mit Hilfe der Carbodiimid-Kupplung wurde Aldolase kovalent auf einer Gold-Scheibenelektrode immobilisiert und mittels pH-Titration in Gegenwart von Redoxmarkern untersucht, im Vergleich zu weiteren modifizierten Oberflächen, die jeweilige Stufen des Kupplungsschemas repräsentieren: 1. die mit der selbstassemblierenden Monoschicht modifizierte Goldoberfläche (II) und 2. die aktivierte und direkt mit Ethanolamin umgesetzte Oberfläche (ohne Inkubation in Proteinelösung, „Blank“). Die Abbildungen 3-47 und 3-48 zeigen die erhaltenen Strom pH-Abhängigkeiten für $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ und $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$. Es sind jeweils die Strom-pH-Abhängigkeiten gegenübergestellt, welche zuvor an der unspezifisch mit Aldolase modifizierten Goldelektrode beobachtet wurden (siehe auch Tab. 3-2).

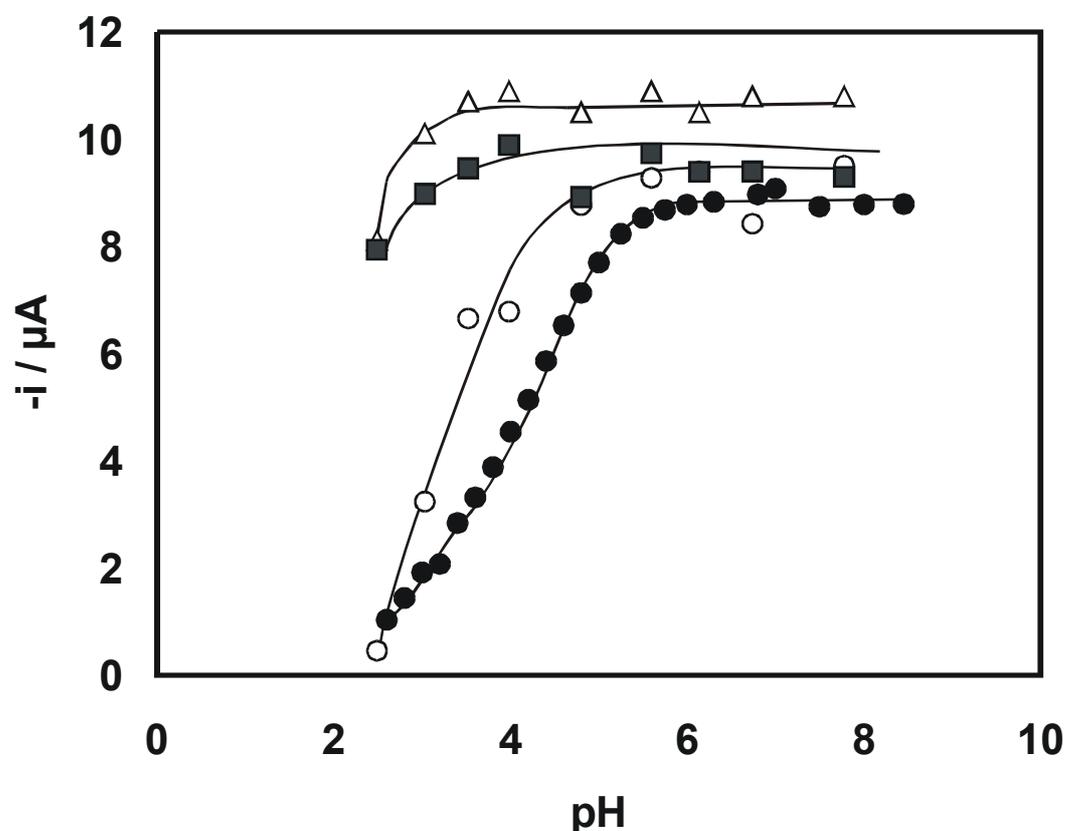


Abb. 3-48: pH-Abhängigkeit der Reduktionsströme von $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ an modifizierten Gold-Scheibenelektroden ($A = 0.07 \text{ cm}^2$) in 0.1 M KCl; SAM von Mercaptopropionsäure (Dreieck); kovalent immobilisierte Aldolase gemäß Schema (weißer Kreis); aktivierte und direkt gequenchte Oberfläche (ohne Proteininkubation) (Quadrat); unspezifisch adsorbierte Aldolase (schwarzer Kreis); $v = 5 \text{ mV/s}$, Amplitude: 25 mV

Die Carboxylgruppen der selbstassemblierten Monoschicht der Dithiodipropionsäure sind bei niedrigen pH-Werten protoniert, und die Stromantwort ist vergleichbar mit der einer blanken

Elektrode. Mit zunehmendem pH-Wert erfolgt Deprotonierung. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ wird durch die negativ geladene Oberfläche repulsiert und der Elektronentransfer unterdrückt. Die Stromabnahme setzt etwa bei $\text{pH} = 4$ ein und erstreckt sich über 4 pH-Einheiten, ein zwei pH-Einheiten größeres Intervall als bei den Signalsprüngen der Protein-Titrations beobachtet wird. Der Halbwertsstrom $i/2$ ist bei $\text{pH}_{i/2} = 5.3$ festzustellen.

Es ist davon auszugehen, dass aufgrund der hohen molekularen Packungsdichte innerhalb der Monoschicht, bei alkalischen pH-Werten ebenfalls eine hohe negative Ladungsdichte resultiert. Diese sollte vergleichsweise größer sein, als die negative Ladungsdichte bei gleichem pH-Wert an einer Schicht negativ geladener Proteinmoleküle. Die Stromantworten an der aktivierten und direkt mit Ethanolamin gequenen Oberfläche, zeigen eine deutlich verminderte Blockade des Elektronentransfers im alkalischen pH-Bereich. Dies ist auf die Umsetzung der Carboxylfunktionen in Amide zurückzuführen, welche dadurch als Träger negativer Ladungen im Alkalischen eliminiert werden. Verbleibende, nicht umgesetzte Carboxylgruppen verursachen die Stromabnahme zwischen $6 < \text{pH} < 8$. Bei $\text{pH}_{i/2} = 6.5$ ist der Halbwertsstrom $i/2$ festzustellen, der demnach im Vergleich zur SAM-modifizierten Elektrode um mehr als eine ganze pH-Einheit ins Alkalische verschoben ist.

Die aktivierte und direkt mit Ethanolamin umgesetzte Oberfläche weist eine gemischte Modifikation von Mercaptocarboxylat und Mercaptoamid auf, welche auch als lateral verdünnter Dithiodipropionsäure-SAM beschrieben werden kann. Hierbei sind die sauren Gruppen in aprotische Amidfunktionen eingebettet und weisen daher eine verminderte Tendenz zur Deprotonierung auf. Die laterale Verdünnung der Carboxylfunktionen geht mit der Verminderung der negativen Ladungsdichte und der Abnahme der Repulsion des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ im Alkalischen einher. Dies erklärt die deutlich verminderte Elektronentransfer-Blockade.

Die beiden Strom-pH-Abhängigkeiten der Protein-modifizierten Elektroden zeigen einen vergleichbaren Kurvenverlauf, wobei eine Verschiebung der mit Carbodiimid-Kupplung modifizierten Elektrode um ca. 0.5 pH-Einheiten ins Alkalische festzustellen ist. Man geht davon aus, dass auch hier eine gemischt-modifizierte Oberfläche vorliegt, in erster Linie aus dem immobilisierten Protein bestehend. Weiterhin sollten nicht mit Protein bedeckte Flächen vorliegen, an denen Carboxylat- und Amidfunktionen exponiert sind. Letztere könnten die Verschiebung der Strom-pH-Abhängigkeit gegenüber der unspezifisch modifizierten Elektrode verursachen.

Für den Reduktionsstrom des $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ sind über den gesamten pH-Bereich maximale konstante Werte an der SAM-modifizierten und der aktivierten / gequenen Elektrode

festzustellen. Bei kleinsten pH-Werten zeigt sich eine Abnahme um ca. 20 %. Man beobachtet bei den Protein-modifizierten Elektroden vergleichbare Kurvenverläufe der Strom-pH-Abhängigkeiten, wobei eine Verschiebung der mit Carbodiimid-Kupplung modifizierten Elektrode um ca. 0.5 pH-Einheiten ins Saure festzustellen ist, verursacht durch die gemischte Modifikation der Oberfläche.

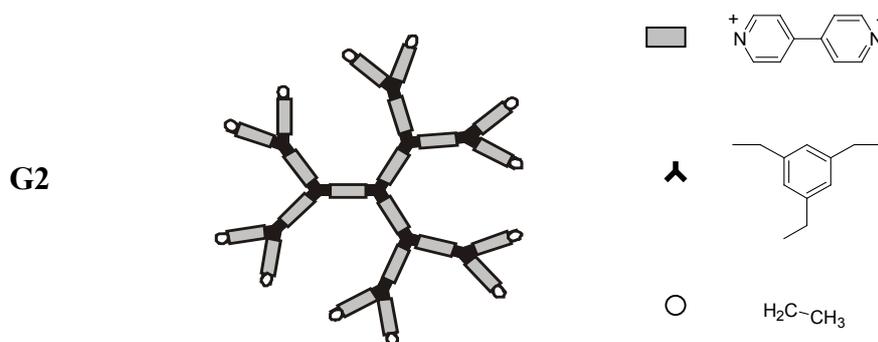
Das Protein wurde kovalent auf der Oberfläche immobilisiert und beeinflusste im Wesentlichen die Stromantwort an der modifizierten Elektrode. Verschiebungen der Strom-pH-Abhängigkeiten im Vergleich zu unspezifisch modifizierten Elektroden werden auf nicht Protein-bedeckte Restflächen zurückgeführt, an denen Carboxylat- und Amidfunktionen exponiert sind, die ebenfalls die Stromantwort beeinflussen. Man geht davon aus, dass die Oberfläche eine geringere Protein-Bedeckung aufweist als die unspezifisch modifizierte.

Die Methode eignet sich zur Qualitäts-Kontrolle schrittweiser Oberflächenmodifikationen.

3.10 Persistente Bindung eines Viologen-Dendrimers an eine Proteinschicht

Heinen, Meier und Walder^[129-131] führten kürzlich elektroaktive Dendrimere mit Viologengerüst ein. Es handelt sich um hoch positiv geladene, sphäroide Moleküle mit verzweigter Struktur. Das für Messungen im Rahmen dieser Arbeit verwendete Dendrimer **G2** enthält 21 Viologen-Redoxzentren und ist entsprechend 42fach positiv geladen, Gegenionen sind 42 Bromid-Ionen pro G2-Dendrimer. Die Verzweigungen werden durch Mesitylen-Brücken bewerkstelligt, an der Peripherie ist das Dendrimer mit Ethylgruppen terminiert.

Die Autoren fanden durch elektrochemische Messungen an der rotierenden Scheibenelektrode einen hydrodynamischen Durchmesser von etwa 5 nm für **G2**.



Es wurde der Einfluss von **G2** auf den Elektronentransfer von $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ in Lösung an einer EF_1 -ATPase-modifizierten Gold-Scheibenelektrode untersucht (vgl. Kap. 2.3).

Der Elektronentransfer des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ war an der EF_1 -ATPase modifizierten Gold-Scheibenelektroden bei $\text{pH} = 9$ effizient unterdrückt, während sich für $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ Reduktionsströme wie an blanken Elektroden zeigten (Abb. 3-49, nächste Seite).

Nach fünfminütigem Eintauchen in einer wässrigen Lösung des elektroaktiven Viologen-Dendrimers **G2** (10 mg / ml) und Spülen mit bidestilliertem Wasser wurden für $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ in der Messlösung bei $\text{pH} = 9$ Oxidationsströme wie an blanken Elektroden beobachtet (Abb. 3-49 u. 3-50, beide nächste Seite).

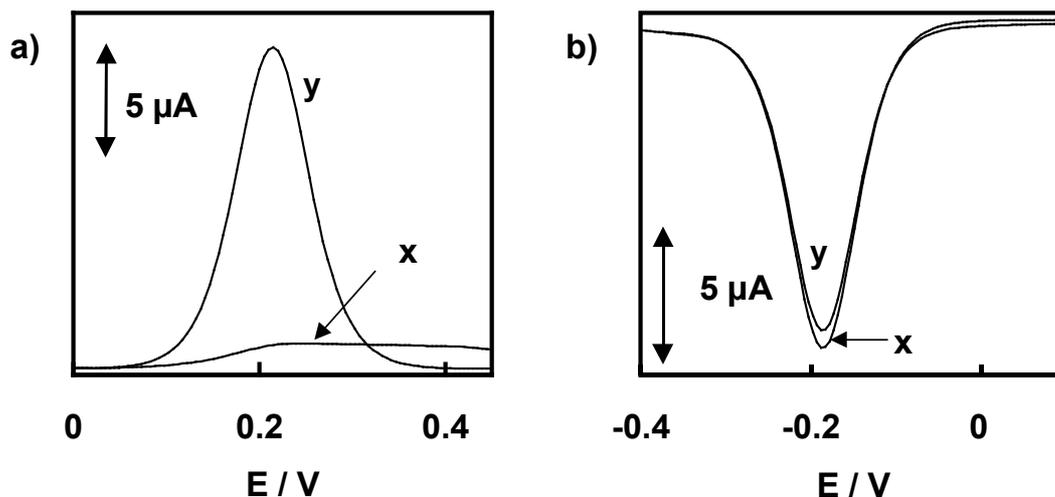


Abb. 3-49: DPV-Stromantwort von a.) $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ und b.) $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ an einer EF_1 -ATPase-modifizierten Gold-Scheibenelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$) in $0.1 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ ($\text{pH} = 9$) vor (x) und nach (y) 5 minütigem Eintauchen in einer Lösung von G2 (10 mg/ml in bidestilliertem Wasser); $\nu = 5 \text{ mV/s}$, Amplitude: 25 mV

Ebenfalls wurden im CV die Redoxwellen des Dendrimers im negativen Potentialbereich detektiert (Abb. 3-50). Die $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Oxidationsströme zeigen eine lineare Abhängigkeit von der Quadratwurzel von ν , die Viologenströme sind jedoch direkt linear abhängig (hier nicht gezeigt).

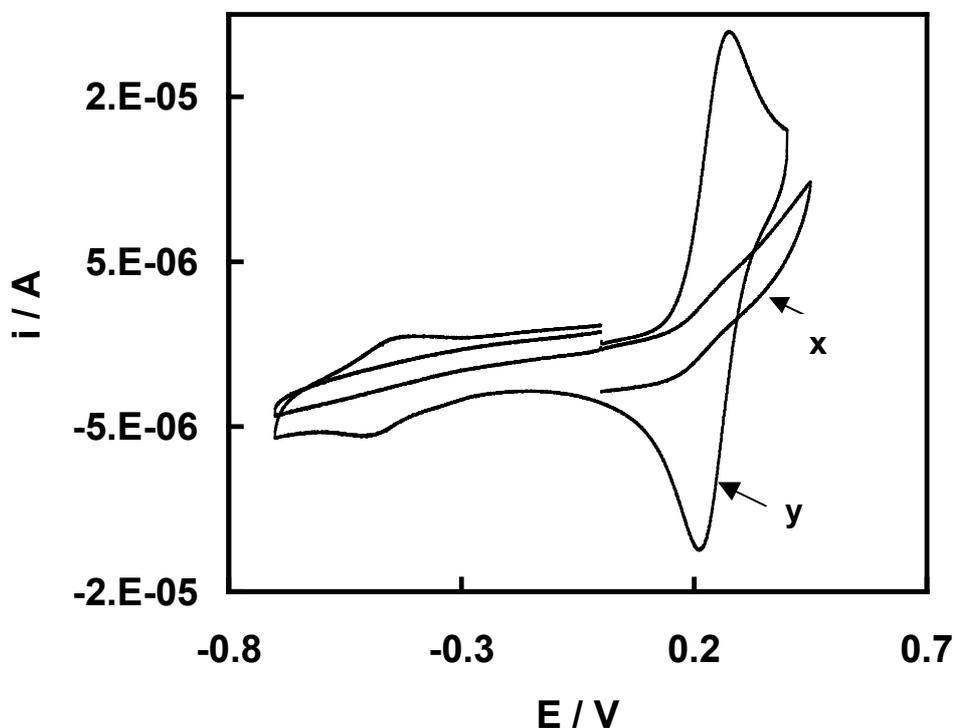


Abb. 3-50: CVs in Gegenwart von $1 \text{ mM Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ an einer EF_1 -ATPase-modifizierten Gold-Scheibenelektrode vor (x) und nach (y) Inkubation in einer Lösung von G2, gemessen in $0.1 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$, $\text{pH} = 9$; $\nu = 0.1 \text{ V/s}$

Für $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ wurden nach Dendrimer-Inkubation im DPV weiterhin Ströme wie an blanken Elektroden (Abb. 3-49) beobachtet.

Nach Eintauchen der Dendrimer-Protein-modifizierten Elektrode in einer wässrigen Lösung bei $\text{pH} = 2$ über Nacht zeigten sich für $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ weiterhin die Stromsignale wie unmittelbar nach Eintauchen in die Dendrimer-Lösung.

Bei $\text{pH} = 9$ ist $\text{EF}_1\text{-ATPase}$ negativ geladen und repulsiert $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, welches daher nicht an die Elektrodenoberfläche diffundieren kann. Der Elektronentransfer ist effizient blockiert. Das hoch positiv geladene Dendrimer **G2** wird an gegenseitig geladenen Protein-Domänen stark elektrostatisch gebunden. Die lineare Abhängigkeit des Reduktionsstroms mit der Vorschubgeschwindigkeit indiziert die Oberflächenfixierung des Dendrimers. Die Adsorption ist irreversibel. Das Dendrimer adsorbiert ebenfalls spontan auf *blanken* Goldoberflächen, daher kann auch ein gewisser Anteil direkt an die Metalloberfläche gebunden sein, die nach Proteinadsorption noch unbedeckt war. Ebenfalls kann Verdrängung von schwach gebundenem Protein erfolgt sein. Integration der Reduktionswelle des Dendrimers bei -0.6 V liefert eine Ladungsdichte von $14.3 \mu\text{C cm}^{-2}$. Unter Annahme einer Ein-Elektronen-Reduktion aller 21 Redoxzentren gelangt man zu einer Oberflächenkonzentration von $7 \cdot 10^{-12} \text{ mol / cm}^2$. Dies entspricht in etwa einer Monoschicht dicht gepackter Dendrimer-Moleküle (siehe Kap. 3-2). Die Elektrode ist demnach mit einem Hybridlayer modifiziert. Die Dendrimer-Schicht bildet die äußere Schicht und sollte demnach auch weitestgehend die Elektronenschleusen-Funktion der Schicht bestimmen und so den dramatischen Anstieg der Oxidationsströme des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ bewirken.

Darunter befindliches Protein wird an der Kontaktfläche zum Dendrimer elektrostatisch neutralisiert und verliert so die Repulsionseigenschaften gegenüber $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. Die Dendrimer-Schicht deckt das Protein vermutlich nicht vollständig ab. Dies erklärt die bleibenden hohen Reduktionsströme des $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$.

An dieser Stelle sei auf eine Arbeit von Pardo-Yissar et al.^[132] hingewiesen, die Polyelektrolyt-Multischichten auf Goldelektroden untersuchten. War eine solche Multischicht mit einem negativen Polyelektrolyten terminiert, so wurde eine deutliche Unterdrückung des Elektronentransfers zum negativ geladenen $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ in Lösung festgestellt. Multischichten mit positivem Polyelektrolyt-Terminus zeigten einen Elektronentransfer, vergleichbar mit dem an einer blanken Goldelektrode, welcher zudem unabhängig von der Gesamtzahl der

einzelnen Polyelektrolyt-Schichten war. Dies wurde mit einer in sich neutralen, porösen Struktur der Multischicht erklärt. Die irreversible Adsorption des Dendrimers auf der Proteinoberfläche ist durch die starke intermolekulare ionische Bindung zu erklären. An der Kontaktfläche der beiden Moleküle kommt es gewissermassen zu einer elektrostatischen Neutralisation (bereits erwähnt). Die Carboxylatgruppen des Proteins werden im sauren Milieu eventuell nicht protoniert und das Dendrimer bleibt weiterhin an der Oberfläche gebunden.

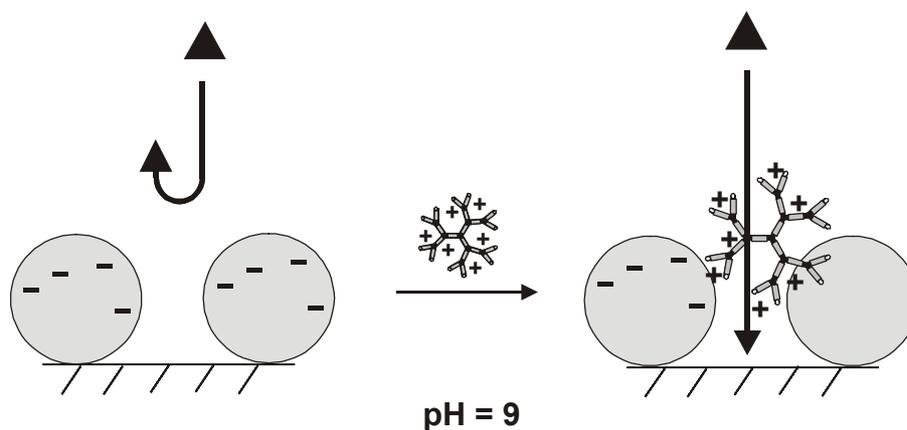


Abb. 3-51: Schematische Darstellung der Induktion des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Oxidationsstroms durch elektrostatische Bindung des Dendrimers an der bei $\text{pH} = 9$ negativ geladenen Protein-Oberfläche; $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ wird angereichert;

Das Experiment kann als Modell einer elektrostatischen Ligandbindung durch ein immobilisiertes Biomolekül betrachtet werden. Hierbei stellt das Dendrimer ein Modell-Substrat / -Liganden dar, dessen Bindung die Oberfläche elektrostatisch umpolt und so die Stromantwort des Redoxmarkers induziert. Es finden sich zahlreiche Beispiele in der Literatur, in denen man sich dieses Prinzip zur Detektion biochemischer Wechselwirkungen zunutze macht (siehe Einleitung, Kap. 3-1).

Wiederholtes (hier 6faches) abwechselndes Einlegen der Elektrode in Proteinlösung und Dendrimer-Lösung bewirkte einen signifikanten Anstieg der Redoxwellen des Dendrimers und auch der Stromantwort des $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (Abb. 3-52, nächste Seite). Dies indiziert den Aufbau von weiteren Schichten, ausserdem zeigt sich die Funktion des Dendrimers als Ionenaustauscher.

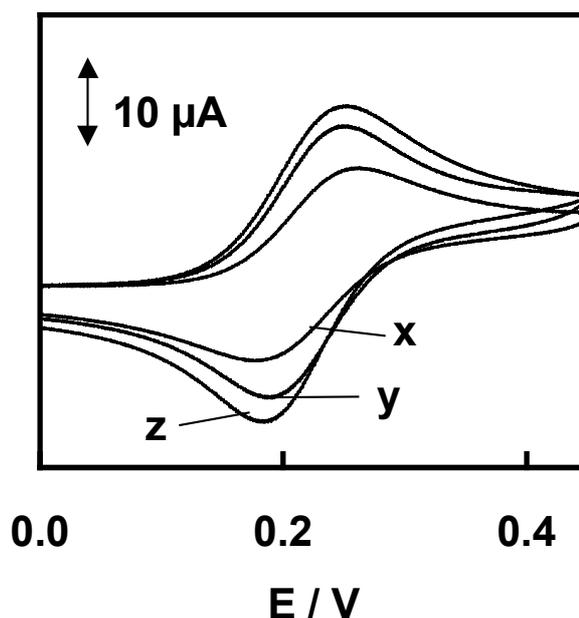


Abb. 3-52: übereinandergelagte CVs in Gegenwart von 1 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ an einer EF_1 -ATPase-modifizierten Gold-Scheibenelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$) vor (x), nach einfacher (y) und nach 6facher abwechselnder (z) Inkubation in einer Lösung von G2 und EF_1 -ATPase, gemessen in 0.1 M Na_2HPO_4 , pH = 9; $\nu = 0.1 \text{ V/s}$

Messungen mit der Quarzmikrowaage (Kleinst-Volumen-Messzelle) bestätigten den Aufbau von Multischichten (hier nicht gezeigt). So adsorbierte das Dendrimer irreversibel auf einer Proteinschicht. Anschließend adsorbierte wieder das Protein an der Dendrimer-terminierten Oberfläche, jedoch in reduziertem Maße im Vergleich zu einer blanken Gold-Oberfläche. Abgesehen von der blanken Goldoberfläche, adsorbierte das Dendrimer nur an der Protein-terminierten bzw. das Protein nur an der Dendrimer-terminierten Oberfläche.

So können durch elektrostatische Wechselwirkungen Schichtstrukturen aufgebaut werden, die stark vereinfacht als sich abwechselnde Packungen negativ (Protein) und positiv (Dendrimer) geladener, kugelförmiger Moleküle betrachtet werden können. Offensichtlich werden allerdings unvollständige, d.h. „löchrige“ Multischichten ausgebildet, die elektrostatische Eigenschaften sowohl der reinen Proteinschicht, als auch der Dendrimer-schicht aufweisen.

Das globuläre Molekül mit hoher positiver Ladungsdichte reichert negativ geladenes $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ an und verstärkt so dessen Oxidationsstrom auf doppelt so grosse Werte, wie sie für die Ströme an blanken Goldelektroden beobachtet werden.

Im Vergleich zu Violgen 1-induzierten $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ -Strömen zeigen sich in etwa etwa doppelt so grosse Ströme an der mit der Dendrimer-Protein-Multischicht modifizierten Elektrode.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neuartige Modifikationen von Elektrodenoberflächen zur spezifischen und unspezifischen Immobilisierung von Proteinen im Hinblick auf die massenspezifische und voltammetrische Erfassung von Proteinwechselwirkungen untersucht.

Im Zusammenhang mit der massenspezifischen Erfassung von Proteinwechselwirkungen wurde eine Kleinst-Volumen-Messzelle ($V_i = 80 \mu\text{l}$) entwickelt, die, mit einem 5 MHz-Quarz ausgestattet, ein Rauschen von $\Delta f = \pm 0.1 \text{ Hz}$ und eine Langzeitstabilität in wässrigem Milieu von etwa 1-2 Hz / h aufweist. Die Zelle wurde in einer Weiterentwicklung mit Referenz- und Gegenelektrode ausgestattet, die simultane elektrochemische und mikrogravimetrische Messungen ermöglichte. Es wurde ein vollständiger Messplatz eingerichtet, bestehend aus thermostatisierter Kleinst-Volumen-QCM-Messzelle und digitaler Datenerfassung.

Die unspezifische Adsorption von Proteinen auf Goldoberflächen ergab mit der Quarzmikrowaage typischerweise Frequenzabnahmen von 10-80 Hz bei Messzeiten von 10 bis 60 min. Durch Modifikation der Goldoberfläche mit einem in der Literatur beschriebenen Oligoethylenoxid-terminierten Alkylthiol konnte die unspezifische Adsorption von Proteinen auch auf modifizierten Quarzmikrowaagen deutlich herabgesetzt werden.

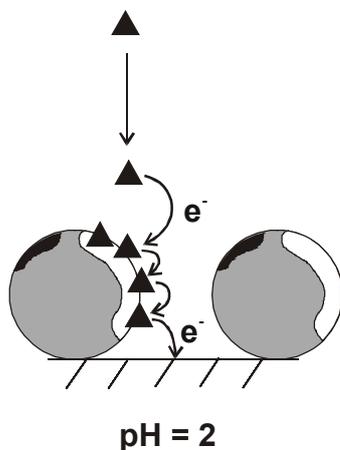
Zur reversiblen, spezifischen Modifikation der QCM-Goldoberfläche wurde eine von Whitesides et al. ^[6] eingeführte Modifikationsmatrix auf die QCM-Oberfläche übertragen. His-TAG modifizierte $\text{EF}_1\text{-ATPase}$ wurde stabil und reversibel an der modifizierten Oberfläche gebunden, die spezifische Proteinbindung an der Oberfläche konnte chemisch ein- und ausgeschaltet werden. Die Dichte der Proteinbindungsstellen in der Immobilisierungsmatrix liess sich durch einen molekularen Verdüner kontrollieren. Die prinzipielle Eignung der verwendeten Kombination von Sensortechnik (QCM) und Oberflächenmodifikation für biochemische Affinitätsstudien wurde demonstriert.

Im Zusammenhang mit Modifikationen von ITO-Substraten wurde ein neuartiger Redoxindikator eingeführt, der es prinzipiell ermöglicht, die Ni-NTA-modifizierten Oberflächen zu charakterisieren und bezüglich der Dichte spezifischer Protein-Bindungsstellen zu quantifizieren.

Die Synthese weiterer Redoxindikatoren mit Thiol-Funktion wird beschrieben.

Von besonderer Bedeutung sind elektrochemische Studien an unspezifisch auf Gold adsorbierten Proteinschichten mit hochgeladenen Redoxindikatoren in Lösung. Diese Untersuchungen wurden an 15 verschiedenen Proteinen mit unterschiedlichem isoelektrischen Punkten durchgeführt.

Nur wenn Protein und Redoxmarker gegensinnig geladen waren, wurden Redoxströme beobachtet (wie bereits in der Literatur beschrieben). Es konnte nun allerdings erstmals gezeigt werden, dass die geladene Redoxspezies an gegensinnig geladenen Protein-Domänen bindet und dass der Elektronentransfer durch die Proteinschichten in Form einer Elektronentransfer- bzw. Selbstaustausch-Kette zwischen Redoxspezies in Lösung und oberflächenakkumulierter Redoxspezies abläuft. Sogenannte „Analyten“, d.h. (Molekül-)Ionen, die mit dem Protein eine elektrostatische Wechselwirkung eingehen, können diese Elektronentransferkette positiv oder negativ beeinflussen. Sie können deshalb an einer Modulation der Stromstärke erkannt werden.



Der ET wird beeinflusst

- durch pH-abhängige Ladungen an Protein-Domänen,
- durch die Ladung der Redoxmarker,
- durch die Ladung des Analyten,

Der Elektronentransfer wird durch die beeinflussenden Parameter verstärkt (Induktion) oder vermindert (Suppression).

Damit wurde erstmals das in der Literatur beschriebene „Ion-Channel-Sensing“ generell mechanistisch aufgeklärt.

Die Ergebnisse wurden verschiedentlich vorgetragen, eine Publikation hierzu ist in Vorbereitung.

5 Experimenteller Teil

5.1 Spezielle Messtechniken

5.1.1 (Elektrochemische) Quarzmikrowaage ((E)QCM)

5.1.1.1 Elektronische Oszillatoren und Frequenzzähler

- PLO-10 “Phase Lock Oscillator”, Maxtek Incorporation, Santa Fe Springs, USA
- Elektronik aus der kommerziell erhältlichen elektrochemischen Quarzmikrowaage EQCM Typ 230, Institut für Physikalische Chemie, Warschau, Polen
- Frequenzzähler Fluke PM6680B / 016

5.1.1.2 Schwingquarze

Sämtliche quarzmikrogravimetrischen Messungen wurden mit 5 MHz AT-geschnittenen plano-plano Schwingquarzen (KVG Neckarbischofsheim) mit einem Durchmesser von 14 mm und einer Dicke von $d_q = 330 \mu\text{m}$ durchgeführt. Die Quarze waren auf beiden Seiten mit Goldelektroden (Schlüsselloch-Muster, 180° zueinander verdreht) von 100 nm Dicke auf 5 nm Chrom als Adhäsionsvermittler versehen ($A = 0.34 \text{ cm}^2$) (Ssens, Niederlande).^[133, 134]

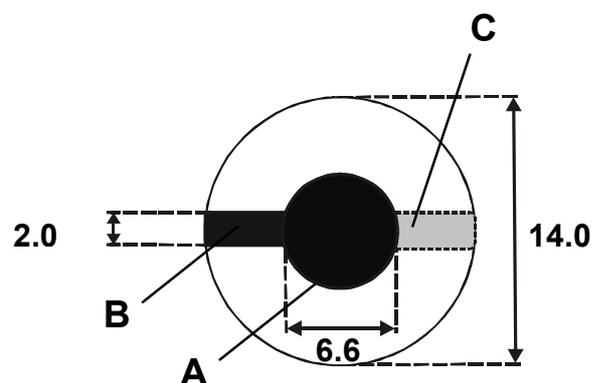


Abb. 5-1: Frontalansicht eines 5 MHz-Quarz, bedampft mit zwei Goldelektroden (vorder- und rückseitig) (100 nm Au auf 5 nm Chrom als Adhäsionsvermittler) in Schlüsselloch-Muster; A: Messseite ($A = 0.34 \text{ cm}^2$), B, C: Leiterbahnen für elektrische Kontaktierung (B: Messseite, C: Rückseite); Maße in mm

5.1.1.3 Kleinst-Volumen-Messzelle

Messung von geringen Mengen Biomaterial bedingt den Einsatz einer Kleinst-Volumen-Messzelle ($V = 80 \mu\text{l}$), die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde (Abb. 5-2 (I)). Eine in der Literatur beschriebene Teflon-Messzelle mit einem inneren Volumen von etwa 1 ml diente als Basis.^[133, 134] Dort ist die Quarzmikrowaage zwischen zwei Teflon-Stücken eingebaut und dient gleichzeitig als Boden der Messzelle. So ist eine Seite der Quarzmikrowaage zur Messlösung und die andere zur Umgebungs-Luft exponiert.

Es wurde ein neuartiger Stopfen¹⁹ aus Teflon entwickelt (Abb. 5-2, (II+III)), der es ermöglichte, Proben aus einem Vorratsgefäß (5 ml Spritzenzylinder) unter vollständigem Volumenaustausch der Messzelle zuzuführen, durch Regulierung des Höhenunterschiedes zwischen externem Reservoir und Probenauslass.

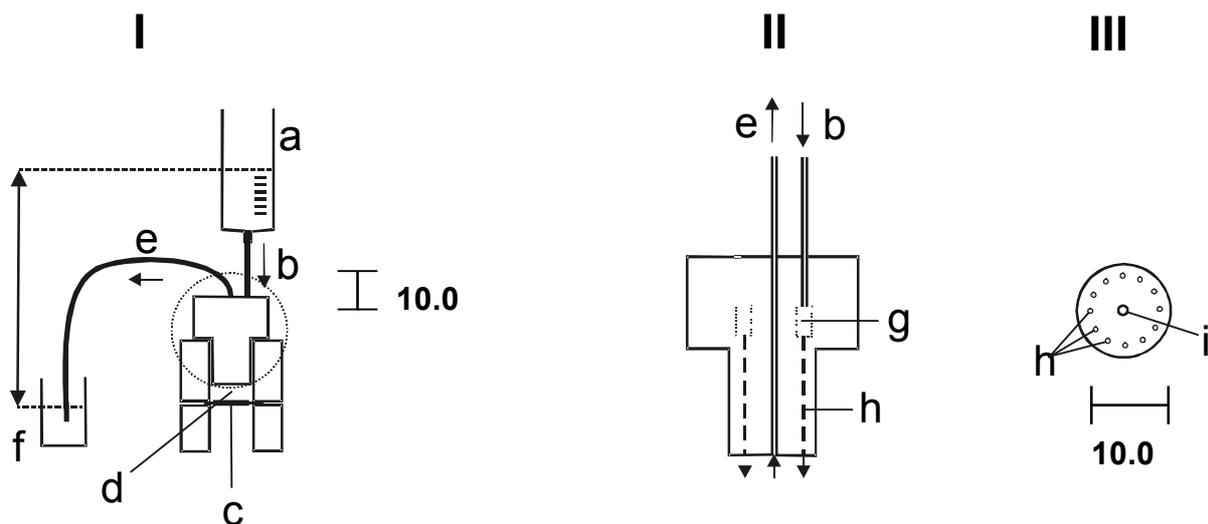


Abb. 5-2: QCM-Messzelle mit radialem Durchfluss (I), der durch den hydrodynamischen Druck kontrolliert wird; Zellvolumen: $V_1 = 80 \mu\text{l}$; Schlauchvolumen: $V_2 = 60 \mu\text{l}$; minimal benötigtes Volumen für vollständigen Austausch: $V_3 = 800 \mu\text{l}$; minimale Gesamtvolumen-Austauschzeit: ca. 30 s;

Schläuche aus Tygon, innerer Schlauchdurchmesser $d_i = 0.89 \text{ mm}$;

I: Schematische Darstellung der Messzellen-Anordnung; II: Querschnitt durch den Stopfen der Messzelle; III: Frontalansicht des Stopfens;

a: Vorratsgefäß (Spritzenzylinder); b: Schlauch-Einlass; c: Schwingquarz; d: inneres Messzellen-Volumen; e: Schlauch-Auslass; f: Sammelgefäß für Auslass; g: Verteiler-Rinne; h: Einlass-Kanäle ($d = 0.5 \text{ mm}$); i: Schlauch-Auslass; Maße in mm

¹⁹ Konstruktion durch Holger Heine und Johannes Dreyer, Feinmechanische Werkstatt (Fachbereich Physik) der Universität Osnabrück

Die Probelösung fließt von dem Vorratsgefäß (5 ml Spritzenzylinder) (siehe Abb. 5-2, (a)) durch den Einlass-Schlauch (b) in eine Verteiler-Rinne, wird auf die 12 Einlass-Kanäle (h) weitergeleitet und strömt radial von außen auf die Schwingquarzoberfläche (c). Der Auslass-Schlauch (e) befindet sich in der Mitte des Stopfens, über welchen die Probelösung in ein Sammelgefäß (f) fließt. Durch Regulierung der Höhe des Proben-Ausflusses relativ zum Niveau im Vorratsgefäß wird die Messzelle mit der Probe gefüllt. Anheben des Ausflusses über das Vorratsgefäß-Niveau stoppt den Durchfluss. Frequenzsignale werden bei Stillstand der Probelösung festgehalten. Alternativ kann die Probelösung unter ständigem Durchfluss gehalten werden und muss dann im Vorratsgefäß fortwährend erneuert werden. Ein mit Wasser durchströmtes Mantelgefäß aus Messing, welches an ein externes Wasserbad-Thermostat angeschlossen ist und Styropor-Isolierungen dienen der Thermostatisierung der Messzelle (Abb. 5-3).

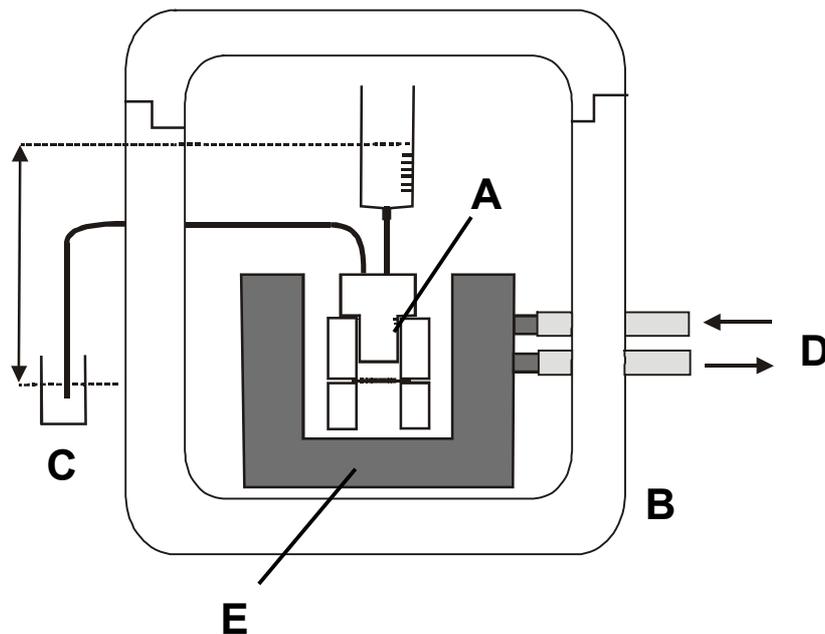


Abb. 5-3: Schematische Darstellung der Messzellen-Anordnung: A: Messzelle, B: Styropor-Isolierung, C: Vorratsgefäß für Auslass, D: Anschluss an Wasserbad-Thermostat, E: Mantelgefäß zur Thermostatisierung

5.1.1.4 Simultane Frequenz- und Resonanzwiderstandsmessung

Für die simultanen Frequenz- und Resonanzwiderstandsmessungen^[135] in Kapitel 2 verwendete man den PLO-10 "Phase Lock Oscillator", Maxtek Incorporation, Santa Fe Springs, USA.

Hierzu war ein Spannungs-Frequenzwandler²⁰ erforderlich, der das Resonanzwiderstandssignal des elektronischen Oszillators, welches in Form einer elektrischen Spannung ausgegeben wurde, in eine Frequenz umwandelte. So speiste man gleichzeitig 2 Frequenzsignale in den Frequenzzähler ((PM6680B / 016 (Fluke)) ein. Anzeige und Auswertung wurden mit einem PC durchgeführt, der mit HP-Vee Software²⁰ programmiert wurde.

Frequenz- und Resonanzwiderstandssignal wurden simultan auf dem Monitor angezeigt. Die weitere Verarbeitung der Messdaten erfolgte mit MS-Excel.

Abb. 5-4 zeigt den vollständigen, eigens eingerichteten QCM-Messstand für simultane Frequenz- und Resonanzwiderstandsmessungen .

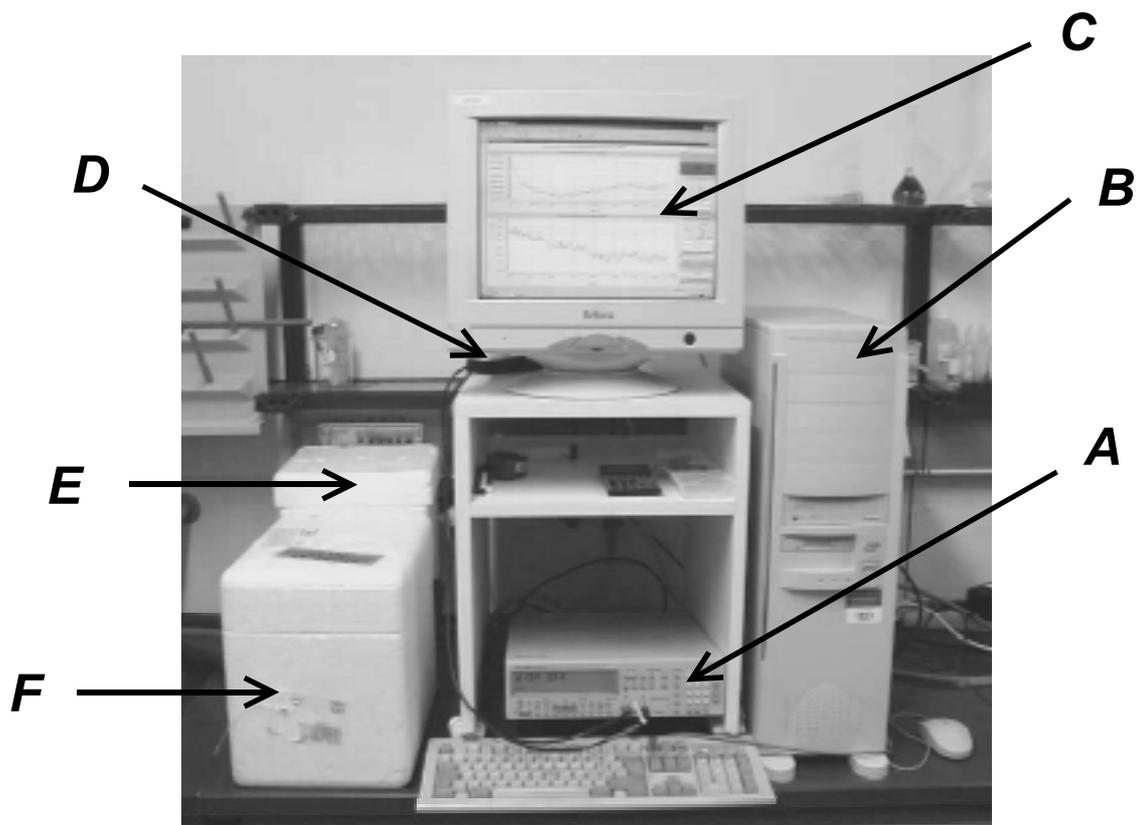


Abb. 5-4: vollständige QCM-Messanordnung; A: Frequenzzähler, B: PC mit HP Vee Software, C: Monitor, D: Spannungs-Frequenz-Wandler, E: Styropor-Gefäß mit Oszillator (PLO 10), F: Styropor-Gefäß mit Messzelle

²⁰ Dirk Rathmann, Elektronikwerkstatt (Fachbereich Physik) der Universität Osnabrück

5.1.1.4.1 Signalrauschen und Drift

Nach Einbau der assemblierten und Elektrolyt-gefüllten Kleinst-Volumen-Messzelle in die QCM-Messanordnung und Anschluss an den elektronischen Oszillator, wartete man zunächst ein stabiles Frequenzsignal ab, welches sich in der Regel nach etwa 30 min einstellte.

Das Frequenzsignal nach der Einschwingphase war mit einem Rauschen von etwa $\Delta f = \pm 0.1 \text{ Hz}$ behaftet, das Resonanzwiderstandssignal mit $\Delta R = \pm 0.2 \Omega$. Mitunter zeigten modifizierte Quarzresonatoren einen Frequenz-Drift von $\pm 1\text{-}2 \text{ Hz/h}$. Die zugehörigen Gesamtfrequenzänderungen wurden in solchen Fällen entsprechend korrigiert oder mit einer entsprechenden Unsicherheit angegeben.

Blanke Gold-Quarzmikrowaagen zeigten vergleichbares Rauschen wie modifizierte Resonatoren und waren oft mit einem größeren schwankenden Drift behaftet.

5.1.1.5 Elektrochemische Quarzmikrowaage (EQCM)

Für die EQCM-Messungen in Kapitel 3 verwendete man die Kleinst-Volumen-Messzelle, ausgestattet mit einem eigens entwickelten Stopfen²¹ (Abb. 5-5), der mit einem Platindraht (als Gegenelektrode) und einem Silberdraht (als Referenzelektrode) versehen war, die an den AUTOLAB PGSTAT 20 (siehe Kap. 5.1.2 Elektrochemie) angeschlossen wurden.

Die Elektronik der kommerziell erhältlichen, elektrochemischen Quarzmikrowaage EQCM Typ 230 (Institut für Physikalische Chemie, Warschau, Polen) wurde als Oszillator für die EQCM-Messungen in Kapitel 3 verwendet. Das Frequenzsignal wurde über einen Frequenzzähler ((PM6680B/016 (Fluke))) ausgelesen und über dessen Analog-Ausgang in den Potentiostaten AUTOLAB PGSTAT 20 eingespeist. Anzeige und Auswertung erfolgte über *GPES for Windows, Version 4.5 (eco-chemie 1998)* und MS-Excel.

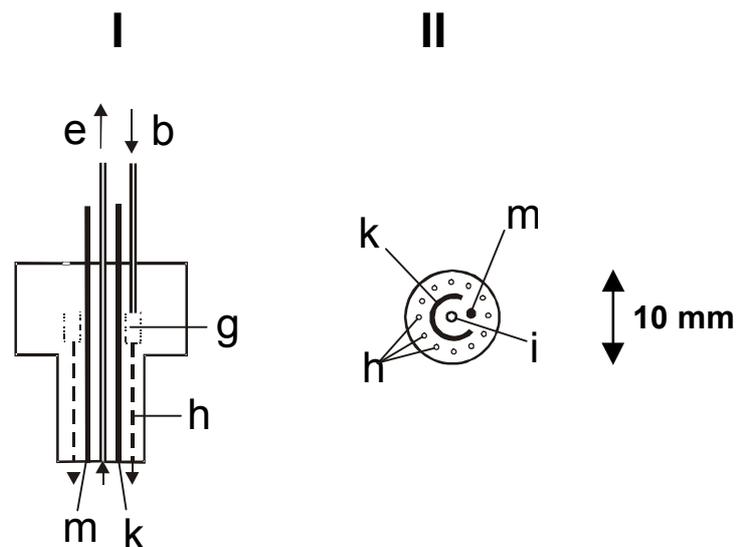


Abb. 5-5: Stopfen der Messzelle für EQCM-Messungen; I: Querschnitt durch den Stopfen der EQCM-Messzelle; II: Frontalansicht des Stopfens;

b: Schlauch-Einlass; e: Schlauch-Auslass; g: Verteiler-Kanal; h: Einlass-Kanäle; i: Schlauch-Auslass;

m: Referenzelektrode (Silberdraht); k: Gegenelektrode (Platindraht);

²¹ Konstruktion durch Holger Heine und Johannes Dreyer, Feinmechanische Werkstatt (Fachbereich Physik) der Universität Osnabrück

5.1.1.6 Bestimmung der integralen Schichtwägemempfindlichkeit

Unter der sog. integralen Schichtwägemempfindlichkeit c_f versteht man den Proportionalitätsfaktor zwischen der Resonanzfrequenzänderung Δf eines Schwingquarzes und der Änderung der arealen Massendichte $\Delta \Gamma_m$ auf der Schwingquarz-Oberfläche durch ein Adsorbat. Gemäß Sauerbrey^[110] gilt folgender linearer Zusammenhang:

$$\Delta f = -c_f \cdot \Delta \Gamma_m \quad (5-1)$$

mit Δf : Frequenzänderung [Hz]; c_f : integrale Schichtwägemempfindlichkeit (5 MHz-Resonator) [$56.6 \mu\text{g cm}^2 \text{Hz}^{-1}$]; $\Delta \Gamma_m$: Änderung der arealen Massendichte [$\mu\text{g cm}^2$]

Die Bestimmung der integralen Schichtwägemempfindlichkeit der verwendeten 5 MHz Schwingquarze erfolgte durch amperometrische Abscheidung von Silber^[138] (1 mM AgNO_3 in 0.1 M HClO_4) auf der QCM-Goldelektrode bei simultaner Erfassung der Frequenzänderung. Die Quarze wurden in die Teflon-Messzelle (siehe Kap. 5.1) montiert, als Referenz diente eine Ag / AgCl-Elektrode, ein platinierter Platindraht als Gegenelektrode. Die QCM-Goldelektrode wurde mit einem Potential von +0.05 V beaufschlagt. Durch Variation der Elektrolysezeit wurden Reduktionsladung und simultane Frequenzänderung als Funktionen der Zeit ermittelt. Man regenerierte zwischen den einzelnen Messungen die Arbeitselektrode durch Positivieren auf ein Potential von +1.0 V, so dass abgeschiedenes Silber wieder vollständig oxidiert wurde. Hierbei stellte sich die ursprüngliche Resonanzfrequenz²² wieder ein. Auftragen der gemessenen Frequenzänderung gegen die zugehörige Reduktionsladung lieferte die in Abb. 5-6 gezeigte Darstellung (nächste Seite). Regressionsanalyse liefert die Geradengleichung: $y = 182.16x$.

Unter Berücksichtigung der Oberfläche der Schwingquarzelektrode ($A = 0.34 \text{ cm}^2$) gelangt man mit der Steigung der Regressionsgeraden zur integralen Schichtwägemempfindlichkeit c_f .

Umformulieren und Auflösen der Sauerbrey-Gleichung (5-1) nach c_f liefert:

$$c_f = \frac{m_{\text{Gerade}} \cdot A_{\text{Elektrode}} \cdot F}{M_{\text{Ag}}} \times \frac{1 \text{ g}}{10^6 \mu\text{g}} \quad (5-2)$$

mit m : Steigung der Regressionsgeraden; A : Fläche der Elektrode [$A = 0.34 \text{ cm}^2$];

F : Faraday-Konstante [96485 C mol^{-1}]; M : Molare Masse von Silber [107.9 g mol^{-1}]

²² $f_0 = 4.988095 \text{ MHz}$

Einsetzen der Zahlenwerte liefert:

$$C_f = \frac{182160 \text{ Hz} \cdot \text{C}^{-1} \cdot 0.34 \text{ cm}^2 \cdot 96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}}{107.9 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} \times \frac{1 \text{ g}}{10^6 \mu\text{g}} \quad (5-3)$$

$$c_f = 55.51 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{Hz}^{-1}$$

Die ermittelte Schichtwäageempfindlichkeit c_f ist in sehr guter Übereinstimmung mit der Sauerbrey-Konstanten ($S_f = 56.6 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{Hz}^{-1}$)^[110] für einen 5 MHz Schwingquarz. Dies bestätigt die einwandfreie Funktionstüchtigkeit des verwendeten elektronischen Oszillators (aus der EQCM, Typ 230, Institut für Physikalische Chemie, Warschau, Polen), einschließlich der verwendeten Schwingquarze und Messzellen-Anordnung.

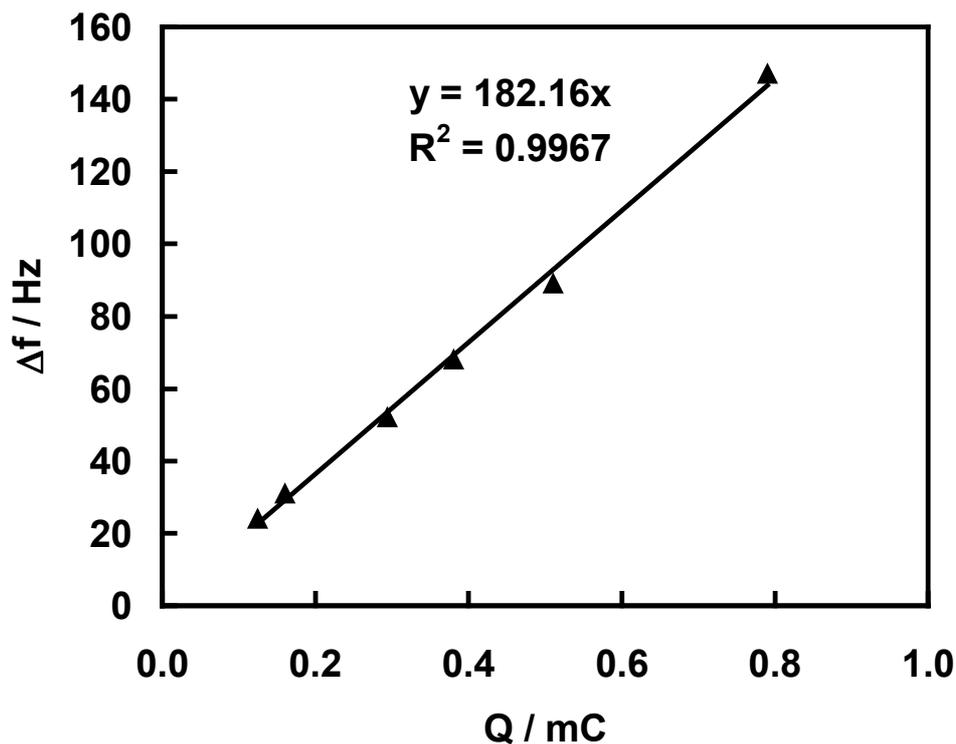


Abb. 5-6: Frequenzabnahme in Abhängigkeit der Reduktionsladung bei Abscheidung von Silber auf der QCM-Goldelektrode ($A = 0.34 \text{ cm}^2$); 1 mM AgNO_3 in 0.1 M HClO_4 ; $E_{\text{kat.}} = +5 \text{ mV vs Ag / AgCl}$

5.1.1.7 AFM-Aufnahme und Rauigkeitsanalyse einer QCM-Goldoberfläche

Die verwendeten 5 MHz-Quarze wurden mit dem AFM untersucht und bezüglich ihrer Rauigkeit analysiert. Die AFM-Messungen wurden mit dem UHV STM / AFM der Fa. Omicron (Taunusstein) durchgeführt.²³ Es wurden Contact Mode Bilder an Luft aufgenommen. (Non-Contact Mode) Linescan.

Die Rauigkeitsanalyse (Scan-Bereich $(1\mu\text{m})^2$) des Quarzes ergab:

$$\text{geometrische Oberfläche: } A_{\text{geo}} = 1.0000 \mu\text{m}^2$$

$$\text{mikroskopische Oberfläche: } A_{\text{mik}} = 1.0302 \mu\text{m}^2$$

$$\text{Rauigkeit: } r = (A_{\text{geo}} / A_{\text{mik}}) = 1.03$$

$$\text{RMS (Root Mean Square) = 2.215 nm}$$

$$\text{RA (Arithmetic Mean) = 1.546 nm}$$

²³ durchgeführt von Martin Görlich, Fachbereich Physik, Universität Osnabrück

5.1.2 Elektrochemie

Cyclovoltammetrie (CV) und Differentielle Pulsvoltammetrie (DPV)

- Potentiostat: AUTOLAB / PGSTAT 20
- Software: GPES for Windows, Version 4.2 (eco-chemie 1995)
- Arbeitselektroden: Gold-Scheibenelektrode (Metrohm 6.1204.140)
(aktive Elektrodenfläche 0.07 cm^2)
Glassy Carbon Elektrode (GC), (Metrohm 6.0804.010),
(aktive Elektrodenfläche 0.07 cm^2)
- Referenzelektrode: Ag/AgCl-Elektrode, (Metrohm 6.0724.140), mit zwei Salzbrücken
(die innere: 3 M KCl-Lösung, die äußere: Leitsalz und Lösungsmittel)
- Gegenelektrode: Platindraht ($d = 1 \text{ mm}$)

Die Messungen mit diesem Dreielektrodensystem wurden in Standard-Messzellen ($V = 5 \text{ ml}$ oder 25 ml) unter Argonatmosphäre und bei RT durchgeführt.

Für die DPV gilt:

Vorschubgeschwindigkeit: $v = 5 \text{ mV} / \text{s}$

Modulationsamplitude: $A = 25 \text{ mV}$

5.1.3 Impedanzspektroskopie

Zur Qualitätskontrolle der selbstassemblierten Monoschichten (Kapitel 2) wurden in der Kleinst-Volumen-Messzelle eingebaute QCM-Elektroden mit einem platinieren Platindraht ($l = \text{ca. } 1 \text{ cm}$, $d = 0.5 \text{ mm}$) als Gegenelektrode impedanzspektroskopisch charakterisiert.^[65]

Die Impedanzspektren wurden mit dem Potentiostat AUTOLAB / PGSTAT 20 (ausgestattet mit dem FRA-Modul (Frequency Response Analyzer) (siehe Kap. 5.1.2 Elektrochemie) unter Zuhilfenahme der FRA-Steuer- und Auswerte-Software durchgeführt. Der gemessene Frequenzbereich erstreckte sich von 0.1 Hz bis 50 kHz . Bei einer Basisspannung von 0 mV wurde die Zwei-Elektrodenanordnung mit einer sinusförmigen Wechselspannung von $+ 40 \text{ mV}$ beaufschlagt.

5.2 Reinigung und Modifikation von Goldelektroden

- Gold-Scheibenelektroden (Metrohm, 6.1204.140; 3 mm Durchmesser, 0.07 cm² geometrische Fläche) wurden mit Alox poliert, ausgiebig mit bidestilliertem Wasser gespült und 30 s in frisch hergestellte, sprudelnde Piranha-Säure (30 % H₂O₂ : H₂SO₄; v/v = 1:3) getaucht. Nach intensiven Spülen mit bidestilliertem Wasser tauchte man die Elektroden für 10 min Ethanol, p.A. spülte mit bidestilliertem Wasser und modifizierte die Elektroden (s.u.).^[140]
- QCM-Goldelektroden wurden für 30 s in frisch hergestellte, sprudelnde Piranha-Säure (30 % H₂O₂:H₂SO₄; v/v = 1:3) getaucht. Nach intensivem Spülen mit bidestilliertem Wasser legte man die Resonatoren für 10 min in Ethanol, spülte erneut mit bidestilliertem Wasser und trocknete im Argonstrom. Die frisch gereinigten und getrockneten Schwingquarze wurden entweder direkt modifiziert oder in die Messzelle eingebaut.
- Zur Modifikation von QCM-Goldelektroden mit *Matrix-Thiol-Monoschichten* (SAMs) legte man die frisch gereinigten Substrate für 12 h in frisch hergestellte 1 mM (Summe der Konzentrationen) ethanolische Lösungen der Matrix-Thiole (im entsprechenden molaren Verhältnis).^[6] Nach intensivem Spülen mit Ethanol und Trocknen mit Argon baute man die modifizierten Schwingquarze in die Kleinst-Volumen-QCM-Messzelle ein. Man füllte die offene Messzelle für 10 min mit 10 mM NaOH und dann für 1 h mit 50 mM Ni₂SO₄ und spülte anschliessend intensiv mit bidestilliertem Wasser.
- Zur Modifikation von Gold-Scheibenelektroden mit *Proteinschichten* legte man die frisch gereinigten Substrate für 1 h in frisch hergestellte Lösungen der Proteine (β = 0.5 mg / ml in 0.1 M KCl). Nach intensivem Spülen mit bidestilliertem Wasser verwendete man die Elektroden entweder direkt für die Messungen, oder bewahrte sie in bidestilliertem Wasser auf.

5.3 Chemikalien und Proteine

Kaliumhexacyanoferrat(II)trihydrat	Merck, p.A.
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Fluka, p.A.
Hexaminruthenium(III)trichloride	Strem chemicals, > 99 %
Citronensäure-Monohydrat	Fluka, p.A.
Kaliumchlorid	Fluka, p.A.
Natriumhydrogenphosphat	Fluka, p.A.
Trinatriumnaphthalintrisulfonat	Sigma
Schwefelsäure	Fluka, p.A. > 98 %
Wasserstoffperoxid	Fluka, p.A. > 30 %
Natriumsulfat wasserfrei	Fluka, puriss, p.a. > 99 %
Ferrocenylethanol	Fluka, p.A.

Lösungsmittel

Chloroform	Prac. Destilliert
Diethylether	Prac. Destilliert
N,N-Dimethylformamid	Fluka, puriss, ≥ 99.5 %
Ethanol	Merck, p.a.
Petrolether	Prac. Destilliert
Ethylacetat	Prac. Destilliert
Isopropanol	Fluka, p.a.
Wasser	Bidestilliert

Proteine

Concanavalin A	Sigma
Cytochrom c aus Pferdeherz	Sigma
Glucoseoxidase aus Spargel	Sigma
Lysozym aus Hühnereiweiss	Sigma
Thyroglobulin aus Schweineschilddrüse	Fluka
Alkohol Dehydrogenase aus Weizen	Fluka
Ferritin aus Pferd milz	Fluka
Catalase aus Spargel	Fluka
β -Glucuronidase	Fluka
Myoglobin aus Pferdeherz	Fluka
Trypsin aus Rinderpankreas	Fluka
Catalase aus Rinderleber	Fluka
Amyloglucosidase aus Spargel	Fluka
Catalase aus Rinderleber	Fluka
Aldolase aus Hasenmuskel	Fluka

5.4 Analytische Messtechniken zur Charakterisierung von Verbindungen

¹H-NMR Spektroskopie

Bruker AC-250 (250 MHz) und *Bruker AMX-500* (500 MHz); Chemische Verschiebung δ in ppm sind bezogen auf TMS ($\delta = 0$) als interner Standard; die Kopplungskonstanten J sind in Hz (Absolutbetrag) angegeben; Multiplizität: s = singulett, d = dublett, dt = dublett von triplets, t = triplett, q = quartett, qu = quintett, m = multipllett, b = breites Signal

¹³C-NMR Spektroskopie

Bruker AMX-500 (125 MHz) und *Bruker AC-250* (63 MHz) mit s sind C, mit d CH-, mit t CH₂- und mit q CH₃- Fragmente bezeichnet; Multiplizität: d = dublett, in Zusammenhang mit den Phosphorkopplungen

Massenspektroskopie

HP 1100 mit HP Chemstation Software (MS Mod. 1946 A)

5.5 Synthesen

5.5.1 Techniken

Dünnschichtchromatographie

DC-Fertigfolien Alugram von *Macherey-Nagel* (40 x 80 mm); Schicht: 0.25 mm Kieselgel mit Fluoreszenzindikator. UV-inaktive Substanzen wurden in der Iodkammer entwickelt.

Säulenchromatographie

Es wurde Silicagel für *Flash-Chromatographie 60* von *Baker* (Korngrösse: 30-60µm) verwendet.

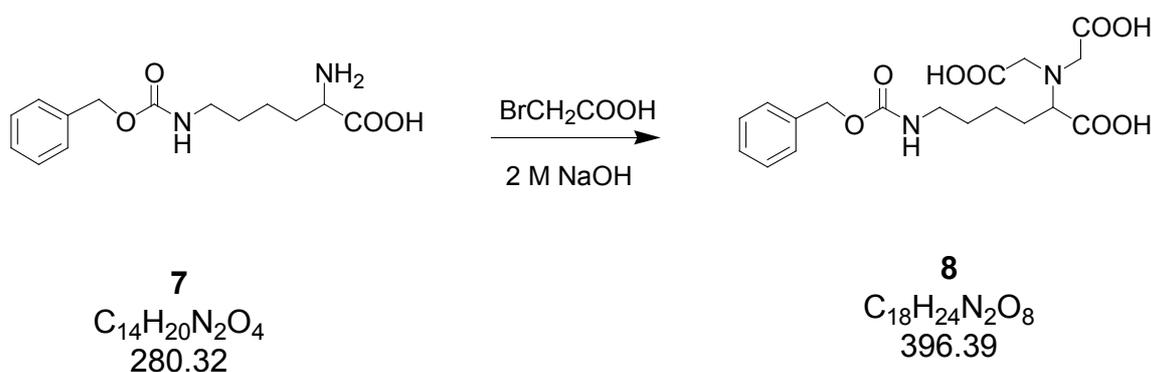
Schmelzpunkt

Apotec (Wena); Es wurde in offener Glaskapillare dreimal gemessen und der Mittelwert genommen.

Xenonlampe

500 XENON 688 68811 Oriel Instruments

5.5.2 Synthese der Matrix-Thiole

 N_α, N_α -Bis[Carboxymethyl]- N_ϵ -[benzyloxycarbonyl]-L-lysin²⁴

72 g (0.51 mol) Bromessigsäure²⁵ wurden in 262 ml (0.52 mol) 2 N NaOH gelöst und auf 0 °C gekühlt. Man tropfte eine Lösung von 50 g (0.18 mol) Z-(ϵ)-Lysin²⁶ in 225 ml 2 N NaOH langsam bei 0 °C hinzu. Nach weiteren 2 h entfernte man die Kühlung und rührte über Nacht weiter. Das Reaktionsgemisch wurde bei 50 °C 2 h gerührt. Nach Abkühlen fügte man 450 ml 1 M HCl hinzu und nutschte den satten, weissen Niederschlag ab. Das Rohprodukt löste man in 200 ml 1 M NaOH auf und fällte anschliessend wieder mit dem gleichen Volumen an 1 M HCl und nutschte ab. Es wurde viermal mit 25 ml 1 M HCl gewaschen. Nach Trocknen im Trockenschrank bei 70 °C über Nacht erhielt man 36.3 g (91.6 mmol) **8** als weissen Feststoff.

Ausbeute: 36.3 g (91.6 mmol) (51 %)

¹H-NMR (250 MHz, D₂O): δ = 1.1-1.3 (m, 2H), 1.4-1.5 (m, 4H), 2.9-3.2 (m, 7H), 5.0 (s, 2H), 7.3 (m, 5H)

MS (API-ES Negative, C₁₈H₂₄N₂O₈): M-H⁺ = 395.5 g/mol

F_p = 172.0 °C

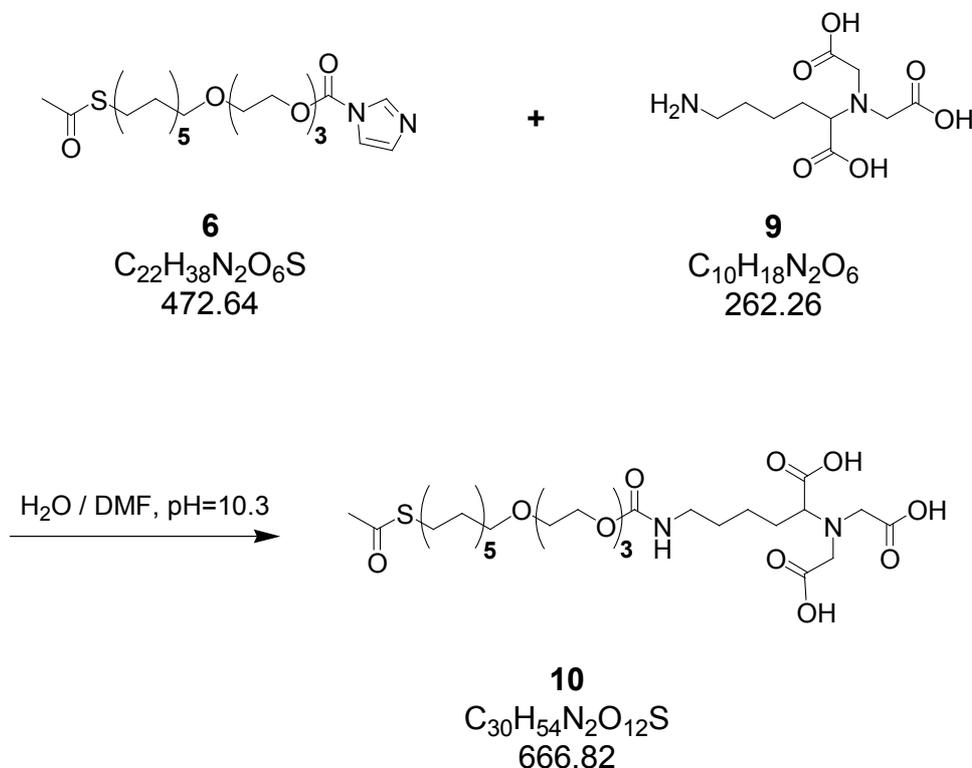
²⁴ In Abweichung zur Literatur-Vorschrift [24] verwendete man einen dreifachen Überschuss an Bromessigsäure zur Steigerung der Ausbeute.

²⁵ Merck, pract.

²⁶ Fluka, purum

N_{α} -{11-[(Methylcarbonylthio)undecyl-1]triethylenglykolcarbonyl}- N_{α} , N_{α}

methylcarboxyl-L-lysine

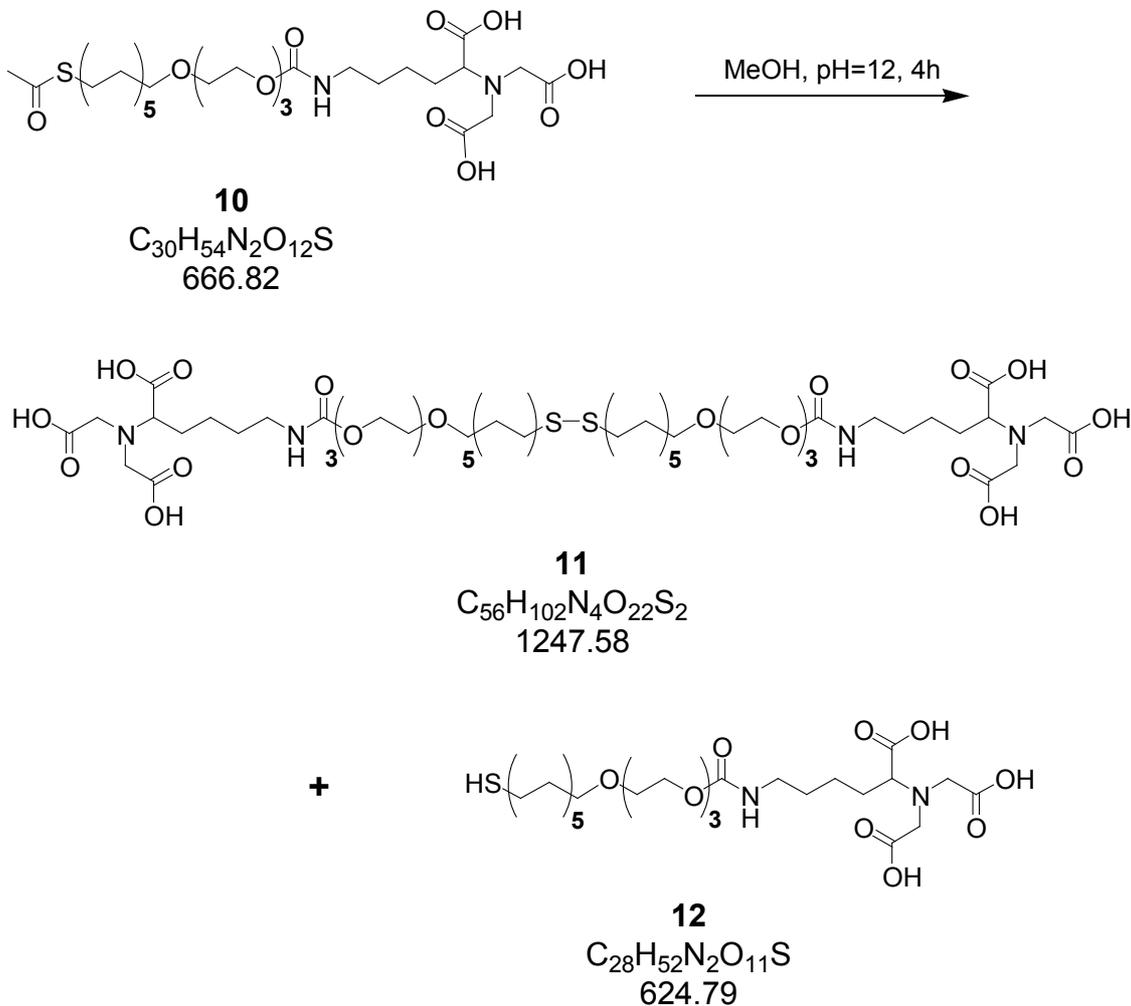


10 g (38.1 mmol) N_{α} , N_{α} -Methylcarboxy-L-lysin **9** wurden in 90 ml bidestilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit 50% iger Natronlauge auf 10.3 eingestellt. Dann tropfte man unter Rühren eine Lösung von 3.8 g (8.0 mmol) [11-[(Methylcarbonylthio)undecyl]-triethylenglykolcarbonylimidazolid **6** in 100 ml DMF hinzu und rührte über Nacht bei RT. Das Reaktionsgemisch wurde in 500 ml Wasser gegossen. Man extrahierte zunächst einmal mit 150 ml Diethylether und verwarf die Etherphase. Dann stellte man den pH-Wert auf 1.5 ein und extrahierte drei mal mit 150 ml Ethylacetat. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen. Man erhielt 1.9 g (2.8 mmol) eines weissen Feststoffes.

Ausbeute: 1.9 g (2.8 mmol) 35 %

¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD): δ = 1.2-1.4 (br m, 14H), 1.4-1.6 (br m, 8H), 1.6-1.8 (br m, 2H), 2.3 (s, 3H), 2.9 (t, 2H), 3.1 (t, 2H), 3.48 (m, 3H), 3.5-3.8 (m, 14H), 4.18 (t, 2H)

MS (APCI Positive, C₃₀H₅₄N₂O₁₂S): M+H⁺ = 667.5 g/mol

N_α-(11-Mercaptoundecyl-1)triethylenglykolcarbonyl-N_α,N_α-methylcarboxyl-L-lysine

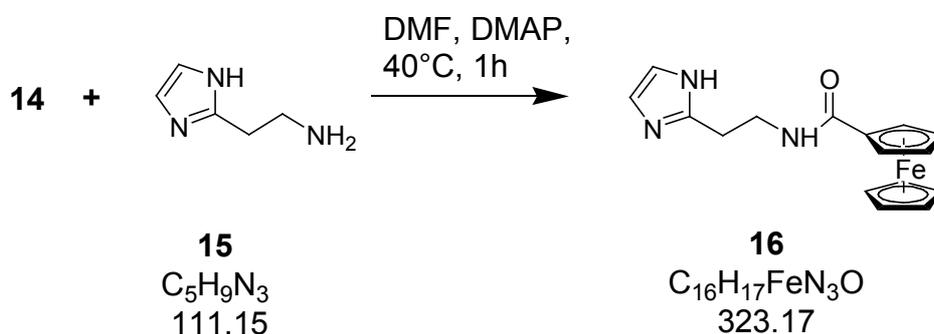
500 mg (0.75 mmol) N_α-[11-[(Methylcarbonylthio)undecyl-1]triethylenglykolcarbonyl-N_α,N_α-methylcarboxyl-L-lysine **10** wurden in 10 ml Methanol gelöst. Man stellte den pH-Wert der Lösung mit 1 M methanolischer NaOH auf 12 (pH-Papier) ein und rührte 4 h bei RT. Anschliessend stellte man den pH-Wert mit 1 M HCl auf 5 ein und rotierte das Lösungsmittel ab. Den Rückstand nahm man in Wasser auf und stellte den pH-Wert mit 1 M HCl auf 1.5 ein, woraufhin ein weisser Niederschlag ausfiel. Die Suspension wurde 3 mal mit Ethylacetat ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Phasen mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abrotiert. Man erhielt 380 mg (0.61 mmol) eines weissen Feststoffes. ¹H-NMR-Analyse des erhaltenen Feststoffes zeigte, dass es sich um ein Disulfid / Thiol-Gemisch handelte mit etwa 25 % Anteil an Disulfid (gemäss Integration ¹H-NMR).

Ausbeute: 380 mg (0.61 mmol, entsprechend Thiol-Molmasse) 81%

$^1\text{H-NMR}$ (250MHz, CD_3OD): $\delta = 1.34$ (br m, 17H), 1.51 (br m, 5H), 1.6-1.8 (br m, 2H), 2.48 (t, 2H), 2.75 (t, 2H), 3.1 (t, 2H), 3.32 (m, 3H), 3.5-3.8 (m, 14H), 4.17 (t, 2H)

MS (API-ES Negative, $\text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S}$): $\text{M-H}^+ = 623.8$ g/mol

5.5.3 Synthese von Ferrocenmonocarbonsäurehistamid



1.3 g (5.6 mmol) Fluorocarbonylferrocen **14** und 0.68 g (5.6 mmol) 4-Dimethylaminopyridin wurden in 60 ml DMF gelöst. Man suspendierte 240 mg (2.2 mmol) Histamin **15**²⁷ in dieser Lösung und erwärmte auf 45 °C, wobei das Histamin ebenfalls in Lösung ging. Die Reaktion wurde für 12 h bei 50 °C gehalten. Das Reaktionsgemisch wurde anschliessend am Rotationsverdampfer eingengt und säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel / MeOH). Nach Abrotieren des Laufmittels am Rotationsverdampfer und Trocknen am HV erhielt man 1.0 g (3.1 mmol) der Verbindung **16** in Form gelber Kristalle.

Ausbeute: 1.0 g (3.1 mmol) 55%

¹H-NMR: (250 MHz, CD₃OD): δ (ppm) = 7.6 (s, 1H), 6.9 (s, 1H), 4.8 (t, ³J = 1.9, 2H), 4.4 (t, ³J = 1.9, 2H), 4,15 (s, 5H), 3,6 (t, ³J = 7.1, 2H), 2,9 (t, ³J = 7.1, 2H)

¹³C-NMR: (63 MHz, CD₃OD): δ (ppm) = 172.5 (C_q), 135.1 (CH), 117.0 (C_q), 75.7 (C_q), 70.7 (CH), 69.8 (CH), 49.0 (CH), 48.7 (CH), 48.3 (CH), 48.0 (CH), 47.7 (CH), 47.32 (CH), 47.0 (CH), 39.4 (CH₂), 27.0 (CH₂)

R_f = 0.5-0.6 (CH₃OH)

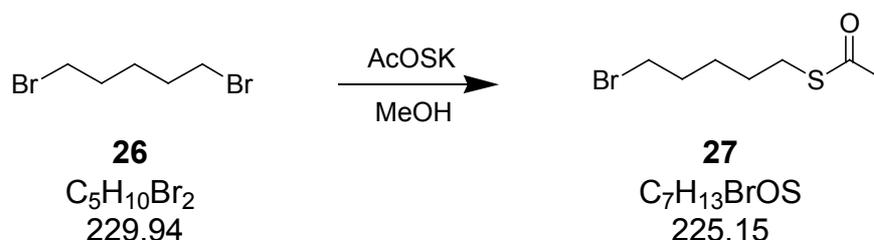
MS (API-ES, Positive, C₁₆H₁₇FeN₃O): M+H⁺ = 324.0 g/mol

E_{1/2} (GC; 0.1 KCl) = + 431 mV vs Ag / AgCl

²⁷ Fluka, puriss

5.5.4 Synthese Mercaptoalkyl-modifizierter Viologenderivate

Thioessigsäure-S-(5-bromo-pentyl)ester

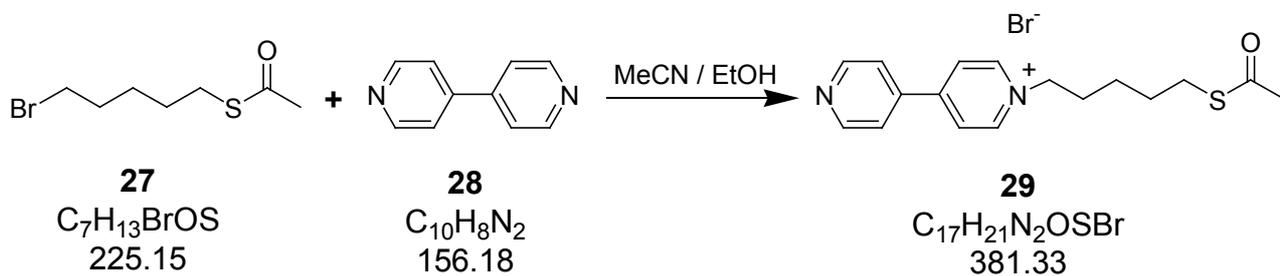


5.7 g (50 mmol) Kaliumthioacetat wurden in 50 ml Methanol gelöst. Man fügte 7.5 ml (55 mmol) 1, 5-Dibrompentan **26** hinzu und kochte das Reaktionsgemisch 2 h unter Rückfluss. Nach Abfiltrieren des weissen Niederschlags reinigte man das Filtrat destillativ auf und erhielt 225 g (11 mmol) Thioessigsäure-S-(5-bromo-pentyl)ester **27** in der Hauptfraktion als farblose, klare Flüssigkeit.

Ausbeute: 4.2 g (18.7 mmol) 34 %

K_p16 mbar = 127 °C

¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD): δ = 1.4-2.7 (m, 4H), 1.8-1.9 (qu, ³J(H, H) = 7.0 Hz, 2H), 2.3 (s, 3H), 2.9 (t, ³J(H, H) = 7.0 Hz, 2H), 2.4 (t, ³J(H, H) = 7.0 Hz, 2H)

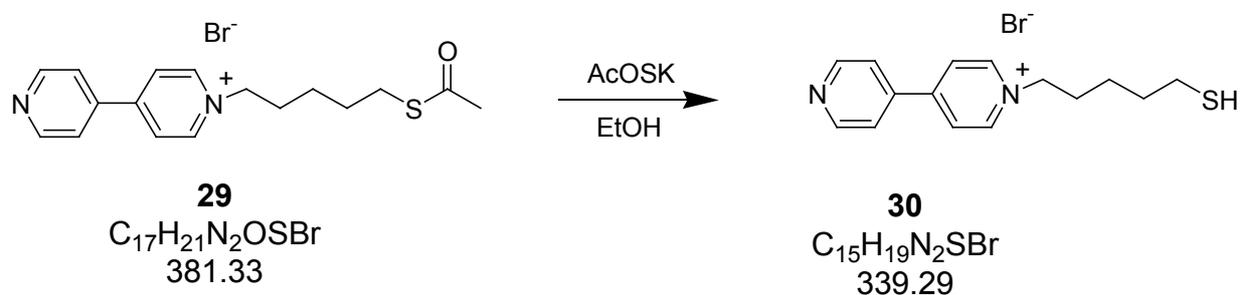
N-Thioacetylpentyl-4,4'-bipyridinium-bromid

3.2 g (14 mmol) 1-Brompentylthioacetat **27** und 1.7 g (11 mmol) 4,4'-Bipyridin **28** wurden in 50 ml Aceton 24 h unter Rückfluss gekocht. Man ließ auf RT abkühlen und stellte die Reaktionsmischung über Nacht in den Kühlschrank. Der ausgefallene Feststoff wurde filtriert und mit Diethylether gewaschen. Nach Trocknen am HV erhielt man 1.1 g (2.9 mmol) **29** in Form eines gelben Feststoffs.

Ausbeute: 1.1 g (2.9 mmol) 26 %

F_p: 188 °C (Zers.)

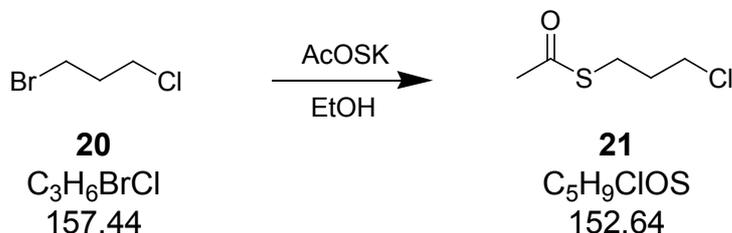
¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD): δ = 1.4 (m, 2H), 1.6 (m, 2H), 2.0 (m, 2H), 2.3 (s, 3H), 2.8 (t, ³J(H, H) = 7.0 Hz, 2H), 4.7 (t, ³J(H, H) = 7.0 Hz, 2H), 8.8 (d, ³J(H, H) = 5.3 Hz, 4H), 9.4 (d, ³J(H, H) = 5.3 Hz, 4H)

N-1-(5-Mercaptopentyl)-4,4'-bipyridiniumbromid

Es wurden 1.4 g (4 mmol) **29** in 50 ml Methanol gelöst. Die Lösung wurde durch wiederholtes (dreimal) Einfrieren und Auftauen am HV entgast. Unter Eis-Kühlung und Argon fügte man 8.3 ml (120 mmol) Acetylchlorid vorsichtig mit einer Spritze hinzu. Man entfernte die Kühlung und rührte weitere 48 h bei RT unter Argon. Das Lösungsmittel wurde am RV abgezogen. Aufreinigung des Rückstandes erfolgte durch Ausfällen aus methanolischer Lösung nach Zugabe von Diethylether. Der Niederschlag wurde mit Diethylether gewaschen und am HV getrocknet. Man erhielt 1.3 g (3.8 mmol) **30** in Form eines schwach gelben Feststoffs.

Ausbeute: 1.3 g (3.8 mmol) 95 %

1H -NMR (250 MHz, DMSO): δ = 1.4 (m, 2H), 1.6 (m, 2H), 2.0 (m, 2H), 2.7 (t, $^3J(H, H) = 6.9$ Hz, 2H), 2.7 (m, 1H), 4.7 (m, 2H), 8.4 (d, 2H), 8.8 (d, $^3J(H, H) = 5.6$ Hz, 2H), 9.0 (d, $^3J(H, H) = 5.6$ Hz, 2H), 9.4 (d, $^3J(H, H) = 5.6$ Hz, 2H)

Thioessigsäure-S-(3-chloro-propyl)ester

5.7 g (50 mmol) Kaliumthioacetat wurden in 50 ml Ethanol gelöst. Man fügte 5.4 ml (55 mmol) 1-Brom-3-chloropropan **20** hinzu und kochte das Reaktionsgemisch 2 h unter Rückfluss. Nach Abfiltrieren des weissen Niederschlags reinigte man das Filtrat destillativ auf und erhielt 5,6 g (37 mmol) Thioessigsäure-S-(3-chloro-propyl)ester **21** in der Hauptfraktion ($K_{p16\text{mbar}} = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$) als farblose, klare Flüssigkeit.

Ausbeute: 5,6 g (37 mmol) 67 %

¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD): $\delta = 2.0\text{-}2.1$ (qu, ³J(H, H) = 6.7 Hz, 2H), 2.3 (s, 3H), 3.0 (t, ³J(H, H) = 6.7 Hz, 2H), 3.0 (t, ³J(H, H) = 6.7 Hz, 2H)

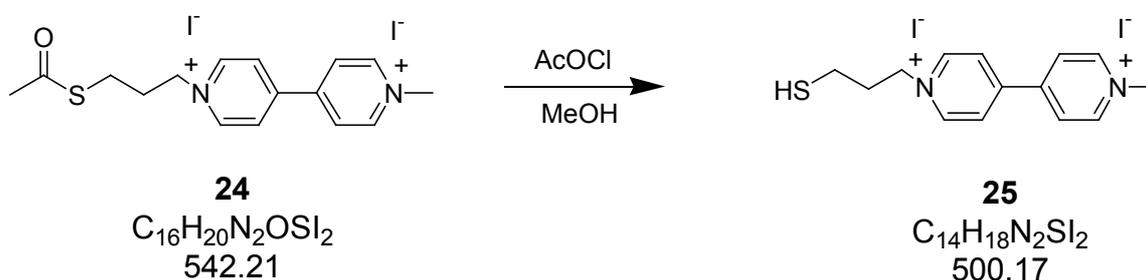
70 h rückfließt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und zweimal mit 25 ml Ether gewaschen und am HV getrocknet. Man erhielt 2.8 g (5 mM) **24** in Form eines orangenen Feststoffs.

Ausbeute: 2.8 g (5 mM) 26 % .

F_p: ca. 253 °C

¹H-NMR (250 MHz, D₂O): δ = 2.2 (t, ³J(H, H) = 6.9 Hz, 2H), 2.3 (s, 3H), 2.8 (t, ³J(H, H) = 6.9 Hz, 2H), 4.4 (s, 3H), 4.6 (t, ³J(H, H) = 6.9 Hz, 2H), 8.4-8.5 (m, 4H), 8.9 (d, ³J(H, H) = 5.8 Hz, 2H), 9.0 (d, ³J(H, H) = 5.8 Hz, 2H)

N-Methyl-N'-1-(3-mercaptopropyl)-4,4'-bipyridinium-dijodid



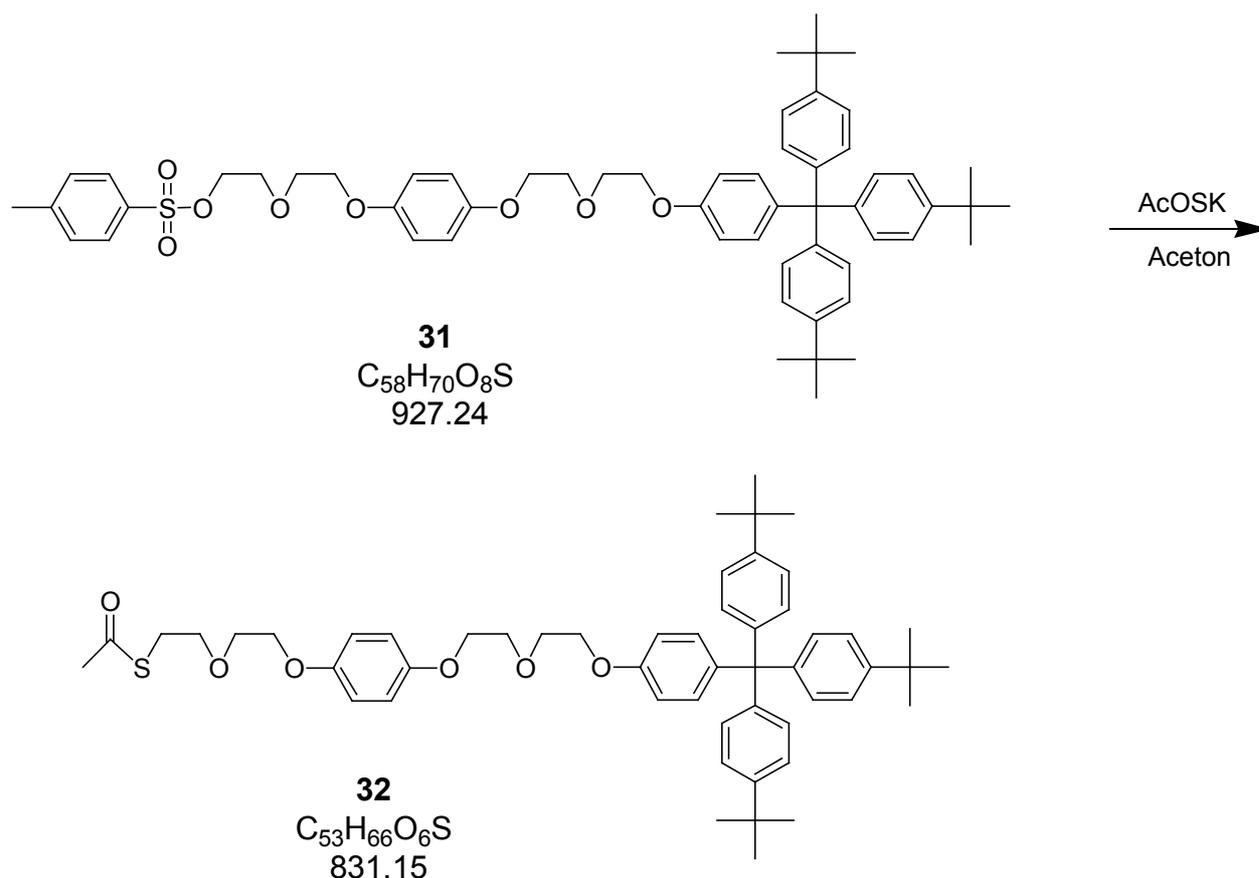
Es wurden 2.11g (3.9 mmol) **24** in 50 ml Methanol gelöst. Die Lösung wurde durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen am HV entgast. Unter Eis-Kühlung und Argon fügte man 8 ml (120 mmol) Acetylchlorid vorsichtig mit einer Spritze hinzu. Man entfernte die Kühlung und rührte weitere 48 h bei RT unter Argon. Das Lösungsmittel wurde am RV abgezogen. Aufreinigung des Rückstandes erfolgte durch Ausfällen aus methanolischer Lösung nach Zugabe von Diethylether. Der Niederschlag wurde mit Diethylether gewaschen und am HV getrocknet. Man erhielt 1.25 g (2.5 mmol) **25** in Form eines roten Feststoffs.

Ausbeute: 1.25 g (2.5 mmol) 64 %

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, D_2O): $\delta = 2.3$ (qu, $^3\text{J}(\text{H}, \text{H}) = 6.8$ Hz, 2H), 2.5-2.6 (t, $^3\text{J}(\text{H}, \text{H}) = 6.8$ Hz, 2H), 4.4 (s, 3H), 4.8 (t, $^3\text{J}(\text{H}, \text{H}) = 6.8$ Hz, 2H), 8.4-8.5 (t, $^3\text{J}(\text{H}, \text{H}) = 6.4$ Hz, 4H), 8.9 (d, $^3\text{J}(\text{H}, \text{H}) = 7.0$ Hz, 2H), 9.0 (d, $^3\text{J}(\text{H}, \text{H}) = 7.0$ Hz, 2H)

5.5.5 Synthese Thiolmodifizierter Rotaxan-Elemente

Thioessigsäure-S-(2-{2-[2-(4-{2-[2-(2-{4-[tris-(4-tert-butyl-phenyl)-methyl]-phenoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-phenoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethyl) ester



140 mg (0,151 mmol) **31** wurden in 15 ml Aceton²⁸ gelöst und eine Lösung von 31 mg (0,27 mmol) Kaliumthioacetat²⁹ in 2-3 ml Aceton hinzugefügt. Das Gemisch wurde für 2 h unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen auf RT wurde ein weißer Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde am RV eingengt, der Rückstand in Methanol suspendiert und im Wasserbad erwärmt. Man ließ auf RT abkühlen, filtrierte den weißen Niederschlag ab und wusch mit Methanol. Nach Trocknen des Rückstands am HV erhielt man 100 mg (0,12 mmol) **32** in Form eines weißen Feststoffs.

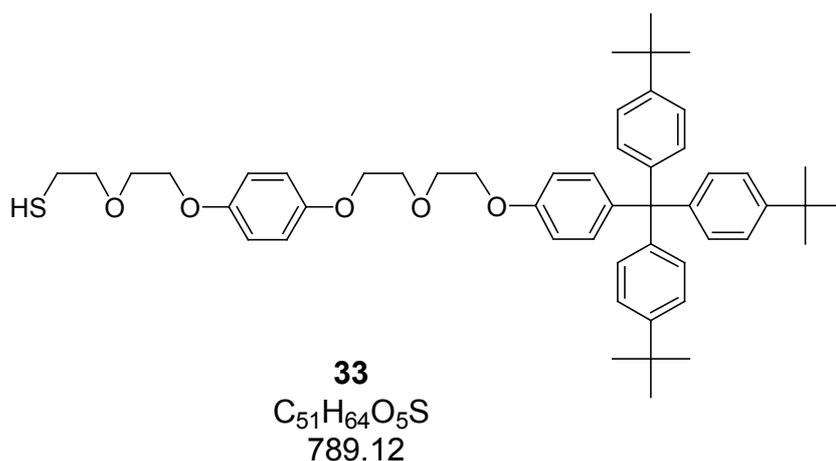
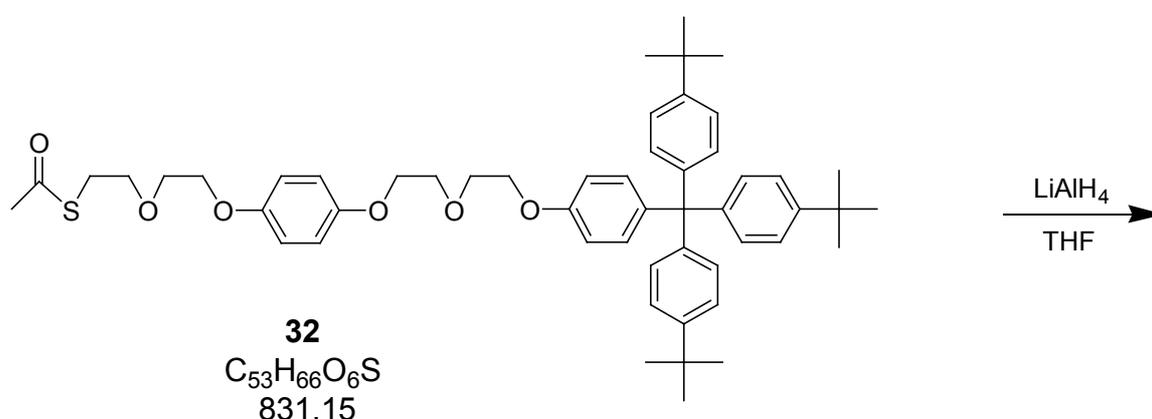
²⁸ Merck, p.A.

²⁹ Fluka, puriss.

Ausbeute: 100 mg (0,12 mmol) 79 %

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 1.4 (s, 27 H), 2.4 (s, 3H), 3.1 (t, 2H), 3.7 (t, $^3\text{J}(\text{H}, \text{H}) = 6.9$ Hz 2H), 3.8 (m, 2H), 3.9 (m, 4H), 4.2 (m, 6H), 6.9 (s, 4H), 7.1 (d, $^3\text{J}(\text{H}, \text{H}) = 7.0$ Hz 8H), 7.3 (d, $^3\text{J}(\text{H}, \text{H}) = 7.0$ Hz, 8H)

2-(2-{4-[2-(2-{4-[Tris-(4-tert-butyl-phenyl)-methyl]-phenoxy}-ethoxy)-ethoxy]-phenoxy}-ethoxy)-ethanethiol



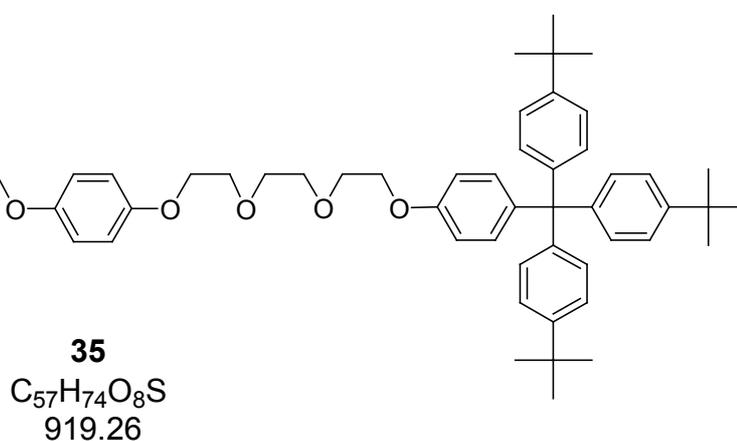
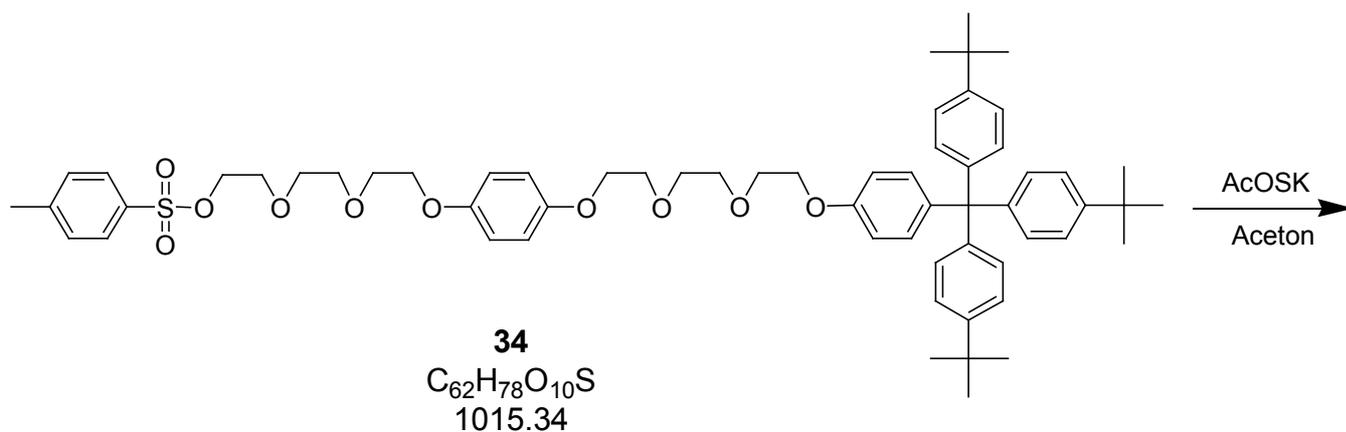
0.026 g (0.69 mmol) LiAlH_4 wurden in 15 ml frisch destilliertem Tetrahydrofuran suspendiert. Man fügte eine Lösung von 191 mg (0.23 mmol) **32** in 15 ml frisch destilliertem THF hinzu und rührte 1 h bei RT unter Argon. Unter Kühlung im Eisbad fügte man zunächst 1 ml bidest. Wasser zum Reaktionsgemisch, anschliessend einige Tropfen 10 %ige H_2SO_4 .

Man trennte die wässrige Phase ab und rotierte die Etherphase ein. Den Rückstand nahm man in Ethylacetat auf und reinigte säulenchromatographisch auf (Kieselgel / Ethylacetat). Nach Abrotieren des Laufmittels und Trocknen am HV erhielt man 80 mg (0.1 mmol) **33** in Form eines weissen Feststoffs.

Ausbeute: 80 mg (0.1 mmol) 43 %

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 1.4 (s, 27 H), 1.7 (t, ³J(H, H) = 6.9 Hz, 1H), 2.8 (q, 2H), 3.7 (t, ³J(H, H) = 7.2 Hz, 2H), 3.8 (m, 2H), 3.9 (m, 4H), 4.2 (m, 6H), 6.9 (s, 4H), 7.1 (d, ³J(H, H) = 5.9 Hz, 8H), 7.3 (d, ³J(H, H) = 5.9 Hz, 8H)

Thioessigsäure-S-[2-(2-{4-[2-(2-{4-[tris-(4-tert-butyl-phenyl)-methyl]-phenoxy}-ethoxy)-ethoxy]-phenoxy}-ethoxy)-ethyl] ester



470 mg (0,463 mmol) **34** wurden in 15 ml Aceton³⁰ gelöst und eine Lösung von 95 mg (0,83 mmol) Kaliumthioacetat³¹ in 2-3 ml Aceton hinzugefügt. Das Gemisch wurde für 2 h unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen auf RT wurde ein weisser Niederschlag abfiltriert.

Das Filtrat wurde am RV eingeeengt, der Rückstand in Methanol suspendiert und im Wasserbad erwärmt. Man ließ auf RT abkühlen, filtrierte den weissen Niederschlag ab und wusch mit MeOH. Nach Trocknen des Rückstands am HV erhielt man 380 mg (0,406 mmol) **35** in Form eines weissen Festoffs.

Ausbeute: 380 mg (0,406 mmol) 88 %

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 1.4 (s, 27 H), 2.4 (s, 3H), 3.1 (t, ³J(H, H) = 6.9 Hz 2H), 3.7-4.2 (m, 22H), 6.9 (s, 4H), 7.1 (d, ³J(H, H) = 8.4 Hz, 8H), 7.3 (d, ³J(H, H) = 8.4 Hz, 8H)

³⁰ Merck, p.A.

³¹ Fluka, puriss.

5.6 Ergänzende Messungen

5.6.1 Bestimmung der pKa-Werte von $\text{H}_3\text{N}^+-\text{Vio}^{++}-\text{NH}_3^+$ und $\text{H}_3\text{N}^+-\text{Vio}^+-\text{NH}_3^+$

$\text{H}_3\text{N}^+-\text{Vio}^{++}-\text{NH}_3^+$ wurde mittels Cyclovoltammetrie bei einer Vorschubgeschwindigkeit $\nu = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ bei RT in 0.1 M KCl im Bereich von 0 bis -0.7 V gegen Ag / AgCl an der Goldscheibenelektrode und der GC-Elektrode vermessen. Der pH-Wert der Lösung wurde durch Zugabe von verdünnter KOH-Lösung bzw. HCl-Lösung im Bereich 2.3 bis 9.7 variiert. Die Cyclovoltammogramme an der Goldelektrode zeigten eine kleinere Peakseparation (60 - 70 mV) als diejenigen an der GC-Elektrode. Aus den Peakpotentialen der Cyclovoltammogramme an der Goldelektrode wurden die Halbstufenpotentiale $E_{1/2}$ bei den verschiedenen pH-Werten berechnet. Diese Werte wurden gegen den pH-Wert der Lösung aufgetragen (Abb. 5-8).

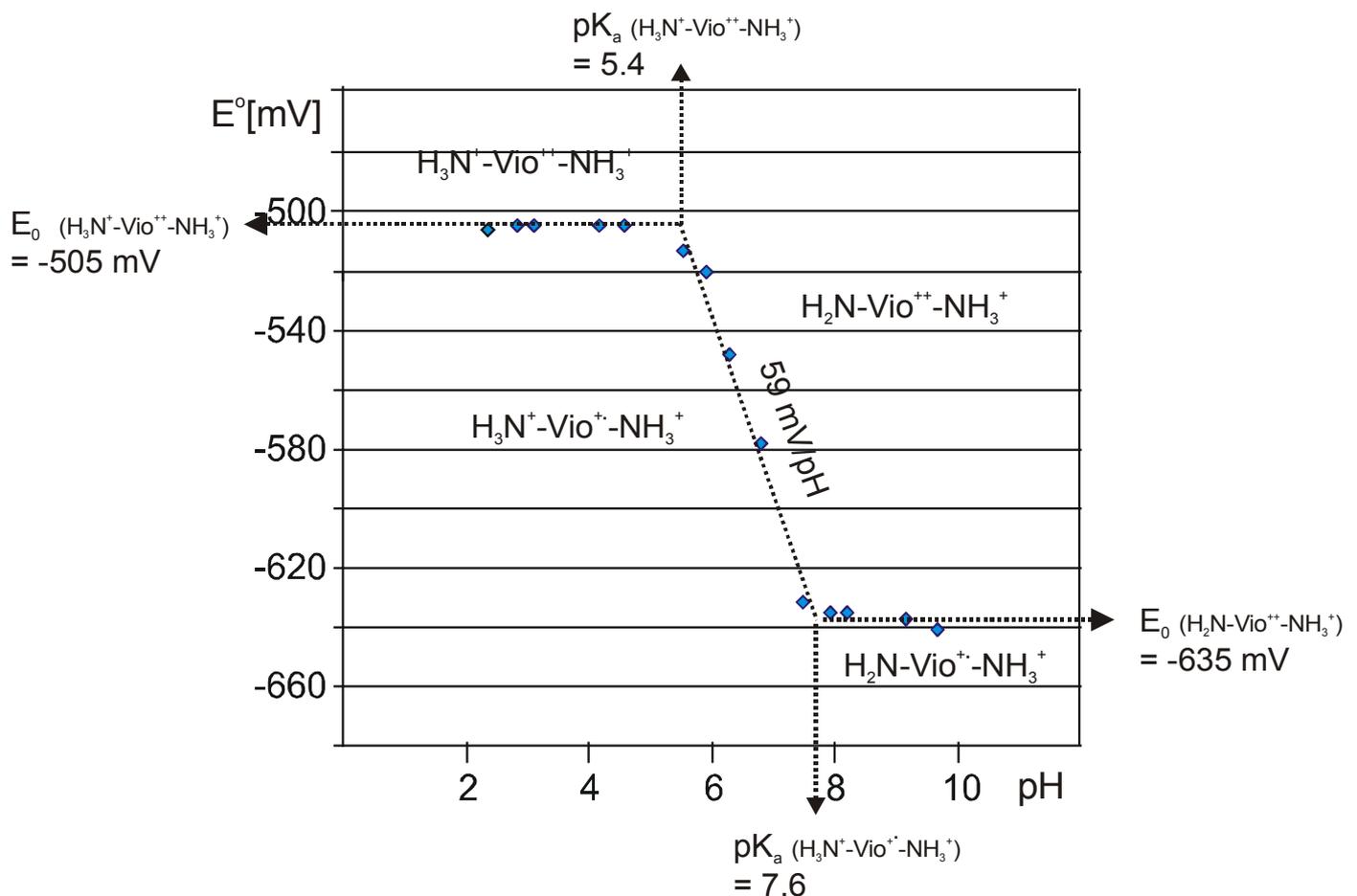


Abb. 5-8: E^0 -pH-Diagramm von $\text{H}_3\text{N}^+-\text{Vio}^{++}-\text{NH}_3^+$ (1 mM in 0.1 KCl) an einer GC-Elektrode, pH eingestellt mit verdünnter HCl- bzw. KOH-Lösung

Für einen an den Elektronentransfer gekoppelten Protonentransfer angewandt auf das System $\text{H}_3\text{N}^+-\text{Vio}^{++}-\text{NH}_3^+$ gilt:

$$E = E^{\circ} + 0.06 \text{ V} \log \frac{[\text{H}_2\text{N}-\text{Vio}^{++}-\text{NH}_3^+]}{[\text{H}_3\text{N}^+-\text{Vio}^{++}-\text{NH}_3^+]} + 0.06 \text{ V} \log [\text{H}^+] \quad (5-4)$$

Experimentell können drei Bereiche unterschieden werden:

- $2 < \text{pH} < 5.4$: keine Abhängigkeit des E° vom pH
- $5.4 < \text{pH} < 7.6$: negative Verschiebung von E° mit basisch werdendem pH
(59 +/- 5 mV / pH-Einheit)
- $7.6 < \text{pH} < 9.5$: keine Abhängigkeit des E° vom pH

Die entsprechenden Ausgleichsgeraden werden interpretiert als Grenzen der Existenzbereiche der 4 Spezies $\text{H}_3\text{N}^+-\text{Vio}^{++}-\text{NH}_3^+$, $\text{H}_3\text{N}^+-\text{Vio}^{+\bullet}-\text{NH}_3^+$, $\text{H}_2\text{N}-\text{Vio}^{++}-\text{NH}_3^+$ und $\text{H}_2\text{N}-\text{Vio}^{+\bullet}-\text{NH}_3^+$.

Entsprechend werden die pK_a -Werte von $\text{H}_3\text{N}^+-\text{Vio}^{++}-\text{NH}_3^+$ und $\text{H}_3\text{N}^+-\text{Vio}^{+\bullet}-\text{NH}_3^+$ herausgelesen:

$$\text{pK}_{a, \text{Vio}^{++}} = 5.4$$

$$\text{pK}_{a, \text{Vio}^{+\bullet}} = 7.6$$

, sowie die Halbstufenpotentiale E° von $\text{H}_3\text{N}^+-\text{Vio}^{++}-\text{NH}_3^+$ und $\text{H}_2\text{N}-\text{Vio}^{++}-\text{NH}_3^+$:

$$E^{\circ}_{-\text{NH}_3^+} = -505 \text{ mV}$$

$$E^{\circ}_{-\text{NH}_2} = -635 \text{ mV}.$$

5.6.2 pH-abhängige Stromantworten an blanken Goldelektroden

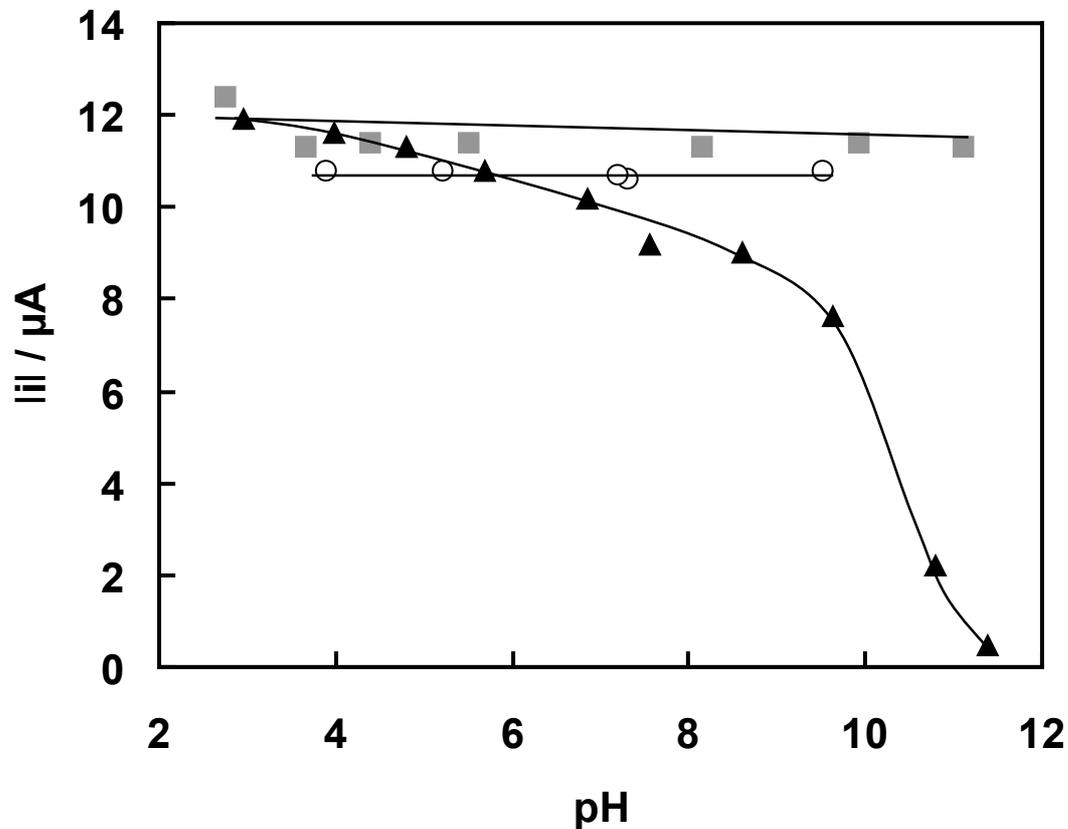


Abb. 5-9: pH-Abhängigkeit der DPV-Redoxströme (betragsmässig aufgetragen) an einer blanken Gold-Scheibenelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$); Dreieck: $1 \text{ mM } Fe(CN)_6^{4-}$ in 0.1 M KCl ; Kreis: $1 \text{ mM } Ru(NH_3)_6^{3+}$ in 0.1 M KCl ; Quadrat: 1 mM Ferrocenylethanol in 0.1 M KCl ; der pH-Wert wurde eingestellt durch Zufügen von verdünnter HCl- bzw. KOH-Lösung; $v = 5 \text{ mV / s}$; Amplitude: 25 mV

Sowohl die Reduktionsströme von $Ru(NH_3)_6^{3+}$ als auch die Oxidationsströme des Ferrocenylethanol weisen über den gesamten untersuchten pH-Bereich konstante, maximale Werte auf (Abb. 5-9). Der Oxidationsstrom von $Fe(CN)_6^{4-}$ nimmt in dem Intervall von $pH = 2$ bis $pH = 9$ gleichmässig um etwa 20% ab und fällt dann innerhalb weiterer 2 pH -Einheiten auf nahezu 0 . Kontaminationen an der Oberfläche als Ursache für die Blockade des Elektronentransfers werden ausgeschlossen, da die Elektrode vor jeder Messung frisch poliert wurde. Man geht davon aus, dass OH^- Ionen aus der alkalischen Lösung an der Goldoberfläche adsorbieren, so dass $Fe(CN)_6^{4-}$ repulsiert und der Elektronentransfer blockiert wird. Konsequenterweise wählte man $pH = 9$ als basische Grenze für weitere Messungen mit $Fe(CN)_6^{4-}$ an Protein-modifizierten Elektroden.

5.6.3 Cyclovoltammetrie von Ferrocenylethanol

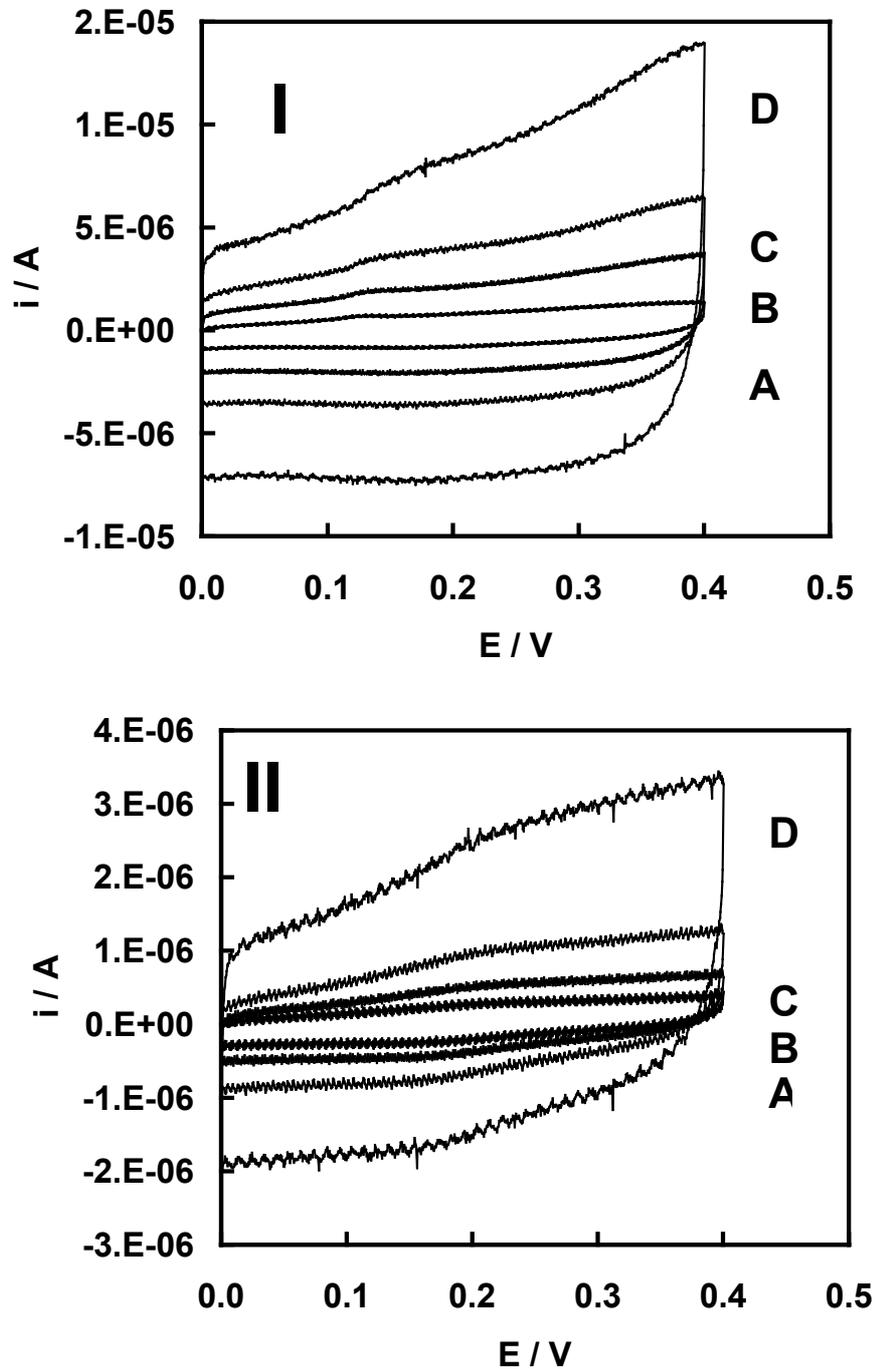


Abb. 5-10: Übereinandergelagerte Cyclovoltammogramme von $5 \mu\text{M}$ Ferrocenylethanol in 0.1 M KCl an I: blanker und II: Thyroglobulin-modifizierter Gold-Scheibenelektrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$) bei unterschiedlichen Vorschubgeschwindigkeiten: A: $\nu = 0.05 \text{ V/s}$, B: $\nu = 0.1 \text{ V/s}$, C: $\nu = 0.2 \text{ V/s}$, D: $\nu = 0.5 \text{ V/s}$; E vs Ag / AgCl

Vergleicht man die CVs der Thyroglobulin-modifizierten Goldelektrode in 0.1 M KCl und $5 \cdot 10^{-6}$ M Ferrocenylethanol mit denjenigen der unmodifizierten Goldelektrode unter ansonsten gleichen Bedingungen, so fällt insbesondere der ca. zehnmal grössere kapazitive Strom bei der nicht modifizierten Elektrode auf.

Sichere Hinweise auf eine Akkumulation der neutralen Redoxspezies an der Oberfläche sind nicht gegeben.

6 Literaturverzeichnis

- [1] C. Ziegler, W. Göpel, *Current Opinion in Chemical Biology* **1998**, 2, 585.
- [2] J. Pehler, Promotion, Universität Tübingen, **1997**.
- [3] A. Ulman, *Academic Press, Boston* **1991**.
- [4] A. Ulman, *Chemical Reviews* **1996**, 96.
- [5] C. D. Hodneland, M. Mrksich, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 4235.
- [6] G. B. Sigal, C. Bamdad, A. Barberis, J. Strominger, G. M. Whitesides, *Analytical Chemistry* **1996**, 68, 490.
- [7] J. J. Ramsden, *Quarterly Reviews of Biophysics* **1994**, 27, 41.
- [8] K. L. Prime, G. M. Whitesides, *Journal of the American Chemical Society* **1993**, 115, 10714.
- [9] Y. Okahata, K. Niikura, H. Furusawa, H. Matsuno, *Analytical Sciences* **2000**, 16, 1113.
- [10] V. M. Mirsky, M. Riepl, O. S. Wolfbeis, *Biosensors & Bioelectronics* **1997**, 12, 977.
- [11] V. M. Mirsky, M. Riepl, C. Krause, I. Novotny, M. Splonskowski, V. Rehacek, V. Tvarozek, H. Hummel, O. S. Wolfbeis, *Trends and New Applications of Thin Films* **1998**, 287-2, 423.
- [12] G. J. Leggett, M. C. Davies, D. E. Jackson, S. J. B. Tendler, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **1996**, 81, 249.
- [13] P. Wagner, M. Hegner, P. Kern, F. Zaugg, G. Semenza, *Biophysical Journal* **1996**, 70, 2052.
- [14] V. B. Hlady, J., *Current Opinion in Biotechnology* **1996**, 7.
- [15] E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Dobeli, R. Gentz, D. Stuber, *Bio-Technology* **1988**, 6, 1321.
- [16] K. L. Prime, G. M. Whitesides, *Science* **1991**, 252, 1164.
- [17] P. Buhlmann, H. Aoki, K. P. Xiao, S. Amemiya, K. Tohda, Y. Umezawa, *Electroanalysis* **1998**, 10, 1149.
- [18] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature* **1975**, 258, 598.
- [19] P. R. Coulet, J. Carlsson, J. Porath, *Biotechnology and Bioengineering* **1981**, 23, 665.
- [20] B. Lonnerdal, J. Carlsson, J. Porath, *Febs Letters* **1977**, 75, 89.
- [21] E. Hochuli, *Genetic Engineering* **1990**, 12, 87.

-
- [22] E. Hochuli, *Journal of Chromatography* **1988**, 444, 293.
- [23] E. Hochuli, *Chimia* **1989**, 43, 184.
- [24] E. Hochuli, H. Dobeli, A. Schacher, *Journal of Chromatography* **1987**, 411, 177.
- [25] L. Schmitt, M. Ludwig, H. E. Gaub, R. Tampe, *Biophysical Journal* **2000**, 78, 3275.
- [26] I. T. Dorn, K. R. Neumaier, R. Tampe, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, 2753.
- [27] E. Hochuli, *Pure and Applied Chemistry* **1992**, 64, 169.
- [28] K. Adachi, R. Yasuda, H. Noji, H. Itoh, Y. Harada, M. Yoshida, K. Kinosita, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, 97, 7243.
- [29] L. Nieba, S. E. NiebaAxmann, A. Persson, M. Hamalainen, F. Edebratt, A. Hansson, J. Lidholm, K. Magnusson, A. F. Karlsson, A. Pluckthun, *Analytical Biochemistry* **1997**, 252, 217.
- [30] P. Rigler, W. P. Ulrich, P. Hoffmann, M. Mayer, H. Vogel, *ChemPhysChem* **2003**, 4, 268.
- [31] P. D. Gershon, S. Khilko, *Journal of Immunological Methods* **1995**, 183, 65.
- [32] E. L. Schmid, T. A. Keller, Z. Dienes, H. Vogel, *Analytical Chemistry* **1997**, 69, 1979.
- [33] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, K. Kinosita, *Nature* **1997**, 386, 299.
- [34] L. Schmitt, C. Dietrich, R. Tampe, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, 116, 8485.
- [35] D. Kroger, M. Liley, W. Schiweck, A. Skerra, H. Vogel, *Biosensors & Bioelectronics* **1999**, 14, 155.
- [36] J. G. Altin, F. A. J. White, C. J. Easton, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **2001**, 1513, 131.
- [37] U. Radler, J. Mack, N. Persike, G. Jung, R. Tampe, *Biophysical Journal* **2000**, 79, 3144.
- [38] D. R. Shnek, *Langmuir* **1994**, 10, 2382.
- [39] T. A. Keller, *Supramolecular Science* **1995**, 2, 155.
- [40] T. Stora, Z. Dienes, H. Vogel, C. Duschl, *Langmuir* **2000**, 16, 5471.
- [41] E. W. Kubalek, S. F. J. Legrice, P. O. Brown, *Journal of Structural Biology* **1994**, 113, 117.
- [42] I. T. Dorn, K. Pawlitschko, S. C. Pettinger, R. Tampe, *Biological Chemistry* **1998**, 379, 1151.

- [43] M. Conti, G. Falini, B. Samori, *Angewandte Chemie-International Edition* **2000**, *39*, 215.
- [44] P. Yim, J. P. Santos, J. G. Forbes, *Biophysical Journal* **1998**, *74*, A186.
- [45] P. D. Boyer, *Biochemistry* **1997**, *66*, 717.
- [46] D. Sabbert, S. Engelbrecht, W. Junge, *Nature* **1996**, *381*, 623.
- [47] J. P. Abrahams, Leslie, A.G., Lutter, R. and Walker J.E., *Nature* **1994**, *370*, 621.
- [48] T. H. Galow, *Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64*, 3745.
- [49] H. C. Delong, D. A. Buttry, *Langmuir* **1990**, *6*, 1319.
- [50] J. C. Yan, S. J. Dong, J. H. Li, W. Q. Chen, *Journal of the Electrochemical Society* **1997**, *144*, 3858.
- [51] P. R. Ashton, M. Grognez, A. M. Z. Slawin, J. F. Stoddart, D. J. Williams, *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 6235.
- [52] R. A. Bissell, E. Cordova, A. E. Kaifer, J. F. Stoddart, *Nature* **1994**, *369*, 133.
- [53] V. Balzani, M. Gomez-Lopez, J. F. Stoddart, *Accounts of Chemical Research* **1998**, *31*, 405.
- [54] V. Balzani, A. Credi, F. M. Raymo, J. F. Stoddart, *Angewandte Chemie-International Edition* **2000**, *39*, 3349.
- [55] T. B. Lu, L. Zhang, G. W. Gokel, A. E. Kaifer, *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 2542.
- [56] R. Ballardini, V. Balzani, W. Dehaen, A. E. Dell'Erba, F. M. Raymo, J. F. Stoddart, M. Venturi, *European Journal of Organic Chemistry* **2000**, 591.
- [57] D. B. Amabilino, P. R. Ashton, V. Balzani, C. L. Brown, A. Credi, J. M. J. Frechet, J. W. Leon, F. M. Raymo, N. Spencer, J. F. Stoddart, M. Venturi, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 12012.
- [58] D. B. Amabilino, P. R. Ashton, S. E. Boyd, M. GomezLopez, W. Hayes, J. F. Stoddart, *Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62*, 3062.
- [59] L. Nieba, A. Krebber, A. Pluckthun, *Analytical Biochemistry* **1996**, *234*, 155.
- [60] R. E. Holmlin, X. X. Chen, R. G. Chapman, S. Takayama, G. M. Whitesides, *Langmuir* **2001**, *17*, 2841.
- [61] D. Schwendel, R. Dahint, S. Herrwerth, M. Schloerholz, W. Eck, M. Grunze, *Langmuir* **2001**, *17*, 5717.
- [62] R. L. C. Wang, H. J. Kreuzer, M. Grunze, *Journal of Physical Chemistry B* **1997**, *101*, 9767.
- [63] J. M. Poudrel, P. Karuso, *Molecules* **2000**, *5*, M179.

-
- [64] J. M. Poudrel, P. Karuso, *Molecules* **2000**, *5*, M180.
- [65] C. Steinem, A. Janshoff, W. P. Ulrich, M. Sieber, H. J. Galla, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1996**, *1279*, 169.
- [66] A. Janshoff, J. Wegener, C. Steinem, M. Sieber, H. J. Galla, *Acta Biochimica Polonica* **1996**, *43*, 339.
- [67] C. Steinem, Dissertation, Münster, **1997**.
- [68] M. Beulen, Dissertation, Universität Twente, **1999**.
- [69] H. O. Finklea, *Electroanalytical Chemistry: A Series of Advances, Vol 19* **1996**, *19*, 109.
- [70] S. Flink, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt, *Advanced Materials* **2000**, *12*, 1315.
- [71] L. M. Goldenberg, M. R. Bryce, M. C. Petty, *Journal of Materials Chemistry* **1999**, *9*, 1957.
- [72] R. F. Lane, A. T. Hubbard, *Journal of Physical Chemistry* **1973**, *77*, 1411.
- [73] P. R. Moses, L. Wier, R. W. Murray, *Analytical Chemistry* **1975**, *47*, 1882.
- [74] M. Sugawara, K. Kojima, H. Sazawa, Y. Umezawa, *Analytical Chemistry* **1987**, *59*, 2842.
- [75] M. Aihara, F. Tanaka, Y. Miyazaki, K. Takehara, *Analytical Letters* **2002**, *35*, 759.
- [76] Z. W. Jiang, W. K. Xin, W. Y. Zhu, X. X. Gao, *Journal of Rare Earths* **1996**, *14*, 246.
- [77] T. Ito, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2001**, *495*, 87.
- [78] M. Takaya, P. Buhlmann, Y. Umezawa, *Mikrochimica Acta* **1999**, *132*, 55.
- [79] K. Takehara, M. Aihara, N. Ueda, *Electroanalysis* **1994**, *6*, 1083.
- [80] K. Takehara, F. Mukae, H. Takemura, *Electrochemistry* **1999**, *67*, 232.
- [81] H. Aoki, K. Hasegawa, K. Tohda, Y. Umezawa, *Biosensors & Bioelectronics* **2003**, *18*, 261.
- [82] P. Buhlmann, S. Amemiya, S. Nishizawa, K. P. Xiao, Y. Umezawa, *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry* **1998**, *32*, 151.
- [83] K. P. Xiao, P. Buhlmann, Y. Umezawa, *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 1183.
- [84] V. P. Y. Gadzekpo, K. P. Xiao, H. Aoki, P. Buhlmann, Y. Umezawa, *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 5109.
- [85] V. P. Y. Gadzekpo, P. Buhlmann, K. P. Xiao, H. Aoki, Y. Umezawa, *Analytica Chimica Acta* **2000**, *411*, 163.
- [86] H. Kuramitz, K. Sugawara, H. Nakamura, S. Tanaka, *Chemistry Letters* **1999**, 725.
- [87] H. Kuramitz, K. Sugawara, S. Tanaka, *Electroanalysis* **2000**, *12*, 1299.

-
- [88] H. Kuramitz, *Bunseki Kagaku* **2002**, *51*, 327.
- [89] K. Sugawara, K. Ueda, H. Kuramitz, S. Hoshi, K. Akatsuka, S. Tanaka, *Chemistry Letters* **2000**, 214.
- [90] H. Kuramitz, M. Matsuda, J. H. Thomas, K. Sugawara, S. Tanaka, *Analyst* **2003**, *128*, 182.
- [91] H. Aoki, P. Buhlmann, Y. Umezawa, *Electroanalysis* **2000**, *12*, 1272.
- [92] H. Aoki, Y. Umezawa, *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1405.
- [93] Y. Katayama, Y. Ohuchi, H. Higashi, Y. Kudo, M. Maeda, *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 4671.
- [94] K. Tohda, S. Amemiya, T. Ohki, S. Nagahora, S. Tanaka, P. Buhlmann, Y. Umezawa, *Israel Journal of Chemistry* **1997**, *37*, 267.
- [95] H. Minami, M. Sugawara, K. Odashima, Y. Umezawa, M. Uto, E. K. Michaelis, T. Kuwana, *Analytical Chemistry* **1991**, *63*, 2787.
- [96] H. Aoki, P. Buhlmann, Y. Umezawa, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1999**, *473*, 105.
- [97] L. Q. Luo, X. R. Yang, E. K. Wang, *Analytical Letters* **1999**, *32*, 1271.
- [98] M. Sugawara, A. Hirano, P. Buhlmann, Y. Umezawa, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **2002**, *75*, 187.
- [99] C. A. Cheng, A. Brajtertoth, *Analytical Chemistry* **1995**, *67*, 2767.
- [100] Q. Cheng, A. BrajterToth, *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 4180.
- [101] Y. Wang, A. E. Kaifer, *Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102*, 9922.
- [102] V. Molinero, E. J. Calvo, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1998**, *445*, 17.
- [103] K. Takehara, Y. Ide, M. Aihara, E. Obuchi, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **1992**, *29*, 103.
- [104] K. Takehara, M. Aihara, Y. Miura, F. Tanaka, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **1996**, *39*, 135.
- [105] Y. L. Liu, M. Q. Zhao, D. E. Bergbreiter, R. M. Crooks, *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 8720.
- [106] M. Q. Zhao, H. Tokuhisa, R. M. Crooks, *Angewandte Chemie-International Edition* **1997**, *36*, 2596.
- [107] J. J. Harris, M. L. Bruening, *Langmuir* **2000**, *16*, 2006.
- [108] S. E. Moulton, J. N. Barisci, A. Bath, R. Stella, G. G. Wallace, *Journal of Colloid and Interface Science* **2003**, *261*, 312.
- [109] Römpp Lexikon Chemie, Thieme Verlag, Stuttgart, **1999**.

-
- [110] G. Sauerbey, *Z. Phys.* **1959**, *155*, 206.
- [111] J. Lahiri, L. Isaacs, J. Tien, G. M. Whitesides, *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 777.
- [112] P. Schön, R. Michalek, L. Walder, *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 3305.
- [113] P. Schön, Diplomarbeit, Universität Osnabrück, **1998**.
- [114] F. Caruso, D. N. Furlong, P. Kingshott, *Journal of Colloid and Interface Science* **1997**, *186*, 129.
- [115] Y. Y. Zhang, Q. J. Xie, A. H. Zhou, S. Z. Yao, *Analytical Sciences* **2000**, *16*, 799.
- [116] F. Hook, J. Voros, M. Rodahl, R. Kurrat, P. Boni, J. J. Ramsden, M. Textor, N. D. Spencer, P. Tengvall, J. Gold, B. Kasemo, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2002**, *24*, 155.
- [117] K. Stulik, C. Amatore, K. Holub, V. Marecek, W. Kutner, *Pure and Applied Chemistry* **2000**, *72*, 1483.
- [118] Bard, A. J, Faulkner, L. R., *Electrochemical Methods*; John Wiley and Sons, Inc. **1980**.
- [119] D. T. S. Swayer, A.; Roberts, J.L., *Electrochemistry for Chemists*; John Wiley and Sons, Inc. **1995**.
- [120] N. Nakashima, T. Taguchi, Y. Takada, K. Fujio, M. Kunitake, O. Manabe, *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1991**, 232.
- [121] N. Oyama, F. C. Anson, *Journal of the Electrochemical Society* **1980**, *127*, 247.
- [122] H. R. Zumbrennen, F. C. Anson, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1983**, *152*, 111.
- [123] A. V. Humble, G. M. Gadd, G. A. Codd, *Water Research* **1997**, *31*, 1679.
- [124] M. A. La-Scalea, S. H. P. Serrano, E. I. Ferreira, A. M. O. Brett, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2002**, *29*, 561.
- [125] R. C. Weast, *Handbook of Chemistry and Physics*; CRC Press **1973**.
- [126] E. M. Boon, S. O. Kelley, T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Clinical Chemistry* **1999**, *45*, 2048.
- [127] E. M. Boon, J. L. Kisko, J. K. Barton, *Redox Cell Biology and Genetics, Pt B* **2002**, 353, 506.
- [128] F. Caruso, E. Rodda, D. F. Furlong, K. Niikura, Y. Okahata, *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, 2043.
- [129] S. Heinen, L. Walder, *Angewandte Chemie-International Edition* **2000**, *39*, 806.
- [130] S. Heinen, W. Meyer, L. Walder, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2001**, *498*, 34.

-
- [131] S. Heinen, Promotion, Universität Osnabrück, **1999**.
- [132] V. Pardo-Yissar, E. Katz, O. Lioubashevski, I. Willner, *Langmuir* **2001**, *17*, 1110.
- [133] A. Janshoff, C. Steinem, M. Sieber, H. J. Galla, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **1996**, *25*, 105.
- [134] A. Janshoff, H. J. Galla, C. Steinem, *Angewandte Chemie-International Edition* **2000**, *39*, 4004.
- [135] S. W. Lee, W. D. Hinsberg, *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 125.
- [136] A. C. Hillier, M. D. Ward, *Analytical Chemistry* **1992**, *64*, 2539.
- [137] D. Voet, J.G. Voet, *Biochemie*, 1. Auflage, VCH, Weinheim, **1994**
- [138] K. Uosaki, *Langmuir* **1997**, *13*, 594.
- [139] G. Z. Sauerbrey, *Z. Phys.* **1959**, *155*, 206.
- [140] S. Flink, B. A. Boukamp, A. van den Berg, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 4652.

7 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ca.	circa
bzw.	beziehungsweise
z.B.	zum Beispiel
Kap.	Kapitel
vgl.	vergleiche
engl.	englisch
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
DPV	Differentielle Pulsvoltammetrie
CV	Cyclovoltammogramm
(E)QCM	(Elektrochemische) Quarzkristallmikrowaage
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	N,N-Dimethylformamid
EtOH	Ethanol
h	Stunde
HV	Hochvakuum
MeOH	Methanol
p.a.	pro analysis
puriss	purissimum
RT	Raumtemperatur
RV	Rotationsverdampfer
MS	Massenspektroskopie
API	Atmospheric Pressure Ionization
ES	Elektrospray
CI	Chemical Ionization
SAM	Selbstassemblierte Monoschicht
LC	Liquid Chromatography
s	Singulett
d	Duplett
t	Triplett
b	breites Signal
m	Multiplett
q	Quartett
qu	Quintett

