



Spektroelektrochemische Untersuchungen von Elektronenübertragungsreaktionen

Michaela Ritter, Georg Wille, Petra Hellwig, letzte Änderung 28.10.2010

1 Motivation

Elektrochemische Prozesse (Übertragung von Elektronen) spielen bei der Energieerzeugung in lebenden Organismen eine zentrale Rolle, z.B. in der photosynthetischen Elektronentransportkette oder in der Atmungskette in den Mitochondrien. Die Reduktion bzw. Oxidation dieser Elektronentransferproteine kann vielfach spektroskopisch verfolgt werden; dies ermöglicht die Bestimmung der Mittelpunktspotentiale und erlaubt Aussagen über den Mechanismus des Redoxprozesses. Im Versuch wird die Elektronentransferreaktion des löslichen Proteins Cytochrom *c* an modifizierten ("biokompatiblen") Elektroden untersucht und sein Redoxzustand spektroskopisch charakterisiert.

2 Grundlagen

2.1 Biologische Redoxsysteme

Die Atmungskette ist ein gutes Beispiel für gekoppelte Elektronentransferreaktionen in biologischen Systemen. Es handelt sich um einen Prozess, bei dem letztendlich eine kontrollierte Reduktion von Sauerstoff erfolgt. Dabei werden Elektronen, die aus der Glykolyse und dem Fettsäureabbau stammen, über membrangebundene Proteinkomplexe und über lösliche Elektronenüberträger auf Sauerstoff übertragen. Die Elektronen nehmen in der Atmungskette den Weg steigender Reduktionspotentiale (siehe Abbildung 1). Gleichzeitig pumpen die Proteinkomplexe Protonen durch die Membran. Der resultierende Protonengradient dient einem weiteren Membranenzym, der ATP-Synthase, zur Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat (P_i).

An der Atmungskette sind vier membrangebundene Enzymkomplexe beteiligt:

- NADH-Dehydrogenase (Komplex I)
- Succinat-Dehydrogenase (Komplex II)
- Cytochrom-*bc*₁- oder Ubichinon-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase (Komplex III)
- Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV)

Als diffusible, elektronenübertragende Carrier zwischen den membrangebundenen Enzymen dienen Ubichinon (UQ) und Cytochrom *c*.

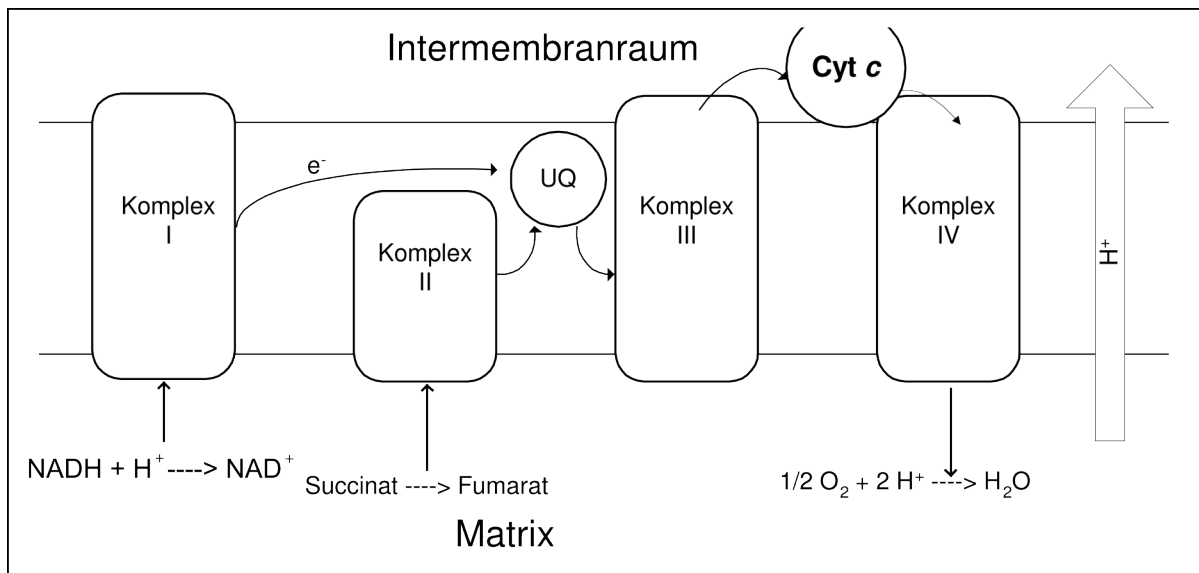


Abbildung 1: vereinfachte Darstellung der inneren Mitochondrienmembran mit den an der Atmungskette beteiligten Enzymen. (Vergleiche Lehrbücher der Biochemie)

Cytochrom *c* ist mit 13 kDa ein relativ kleines Protein mit nur einer Untereinheit. Als **prothetische Gruppe** (Chromophor) liegt eine Häm-Gruppe vor. Dabei handelt es sich um ein planares, mesomeres Tetrapyrrolsystem mit vier Methyl-, zwei Vinylgruppen und zwei Propionsäureseitenketten als Substituenten (Porphyrinsystem). Das zentrale Eisenatom erfährt bei der Elektronenübertragung einen reversiblen Valenzwechsel zwischen den Oxidationsstufe II und III. Ziel des Versuches ist es, elektrochemisch induzierte Differenzspektren von oxidiertem und reduziertem Cytochrom *c* aufzunehmen und das Mittelpunktspotential des Proteins zu bestimmen.

2.2 Elektrochemie

2.2.1 Elektrochemische Grundbegriffe

Nach Vermischen der Lösung eines Oxidationsmittels (z.B. KMnO_4) mit der eines Reduktionsmittels (z.B. FeSO_4) läuft ein Redoxprozess ab, der zu einem Gleichgewicht führt, dessen Lage von den Konzentrationen und den Redoxpotentialen der reagierenden Spezies abhängt. Eine **reversible** Redoxreaktion lässt sich in einer elektrochemischen Zelle erreichen, indem man die Tatsache ausnützt, dass die Redoxkomponenten mit einem Metall Elektronen austauschen können. Durch das variierbare Potential der Elektrode kann so der Redoxzustand der Substanz reversibel verändert werden. In einer **elektrochemischen Zelle** sind mindestens zwei Elektroden (Phasengrenzflächen) so angeordnet, dass sie durch einen Elektrolyten voneinander getrennt sind. Die **Phasengrenzflächen** bestehen in der Regel aus einer Metallelektrode und dem zugehörigen Elektrolyten. **Elektroden** sind also Systeme elektrisch leitender Phasen, wobei eine Phase elektronenleitend und mindestens eine Phase ionenleitend ist. Die Reaktion an der Phasengrenze wird als **Elektrodenreaktion** bezeichnet. Elektrodenreaktionen an jeweils einer Phasengrenze der elektrochemischen Zelle bezeichnet man als **Halbzellenreaktionen**. Die **Durchtrittsreaktion** entspricht dem Austausch von Ladungsträgern (Elektronen bei Redoxelektroden, Ionen bei Metallelektroden) durch die Phasengrenze.

2.2.2 Elektrochemische Thermodynamik

An der Phasengrenze zwischen Metall und Elektrolytlösung einer elektrochemischen Halbzelle bildet sich eine Spannungsdifferenz aus, die man als Galvani-Potential oder elektrisches Potential $\Delta\varphi$ bezeichnet. Sie entspricht der Differenz der inneren elektrischen Potentiale φ der Phasen I und II:

$$\Delta\varphi = \varphi^I - \varphi^{II}$$

Im elektrochemischen Gleichgewicht sind die elektrochemischen Potentiale einer Komponente $\tilde{\mu}_i$ in beiden Phasen gleich.

$$\tilde{\mu}_i^I = \tilde{\mu}_i^{II}$$

Das elektrochemische Potential $\tilde{\mu}_i$ (für T, p = const.) der Komponente i ist die Summe ihrer freien Enthalpie und ihrer elektrostatischen Energie:

$$\tilde{\mu}_i = \mu_i + z_i F \varphi_i = \mu_i^0 + RT \ln a_i + z_i F \varphi_i$$

$\tilde{\mu}_i$ elektrochemisches Potential der Komponente i, μ_i : chemisches Potential, z_i : Wertigkeit, φ_i : elektrisches (Galvani-) Potential μ_i^0 : chemisches Standardpotential, F: Faradaykonstante, R: allgemeine Gaskonstante, T: absolute Temperatur, a_i : Aktivität

Damit lässt sich die Potentialdifferenz berechnen, die sich zwischen Lösung und Metallphase einstellt:

$$\Delta \varphi_i = \varphi_i^I - \varphi_i^{II} = \frac{\mu_i^{0II} - \mu_i^{0I}}{z_i F} + \frac{RT}{z_i F} \ln \frac{a_i^{II}}{a_i^I}$$

Das konzentrationsabhängige elektrische Potential $\Delta \varphi_i$ der Halbzelle wird auch als E_h bezeichnet. Der konzentrationsunabhängige Term der obigen Gleichung enthält nur Konstanten und wird als Standardpotential $\Delta \varphi_i^0$ bezeichnet. Wenn die Aktivitäten a_i der Komponente i in beiden Phasen gleich groß sind, bzw. wenn die Aktivitäten der reduzierten und oxidierten Spezies gleich sind, wird der Quotient a_i^{II}/a_i^I eins und der zweite Term der Summe in Formel wird Null. Deshalb wird das Standardpotential auch als Mittelpunktspotential E_m bezeichnet. Die resultierende Gleichung ist als **Nernst'sche Gleichung** bekannt und beschreibt die Konzentrationsabhängigkeit des elektrochemischen Potentials.

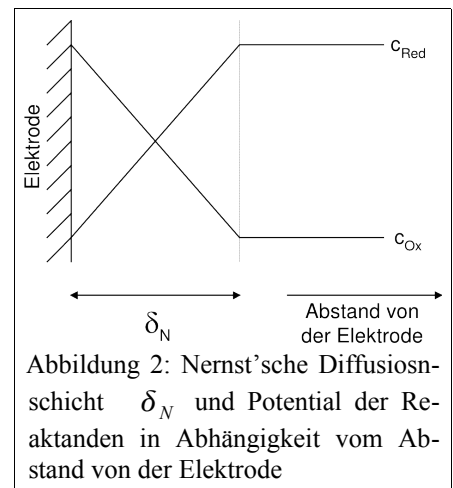
$$\Delta \varphi_i = \Delta \varphi_i^0 + \frac{RT}{z_i F} \ln \frac{a_i^{II}}{a_i^I} \quad \text{oder} \quad E_h = E_m + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_i^{ox}}{a_i^{red}}$$

Voraussetzung ist, dass freie Enthalpie und elektrostatische Energie im Gleichgewicht sind. Die Nernst'sche Gleichung gilt also immer, wenn die Geschwindigkeit der Reaktion an der Elektrode allein von der Diffusion der Moleküle bestimmt wird und wenn die Reaktion reversibel ist.

An der Elektrode bildet sich die in Abbildung 2 dargestellte Nernst'sche Diffusionschicht δ_N aus, durch die die Reaktanden nur durch Diffusion hindurchgelangen können. Die Dicke der Schicht hängt von der Stromdichte ab und liegt typischerweise im Bereich von 10^{-4} m. Die Konzentrationen der Reaktanden an der Elektrode können so erheblich von den Konzentrationen in der Lösung abweichen.

2.2.3 Dreielektrodenanordnung

Das Potential einer Halbzelle kann nur mit Hilfe einer zweiten Halbzelle relativ zu deren (konstantem) Potential gemessen werden. Die Werte der Standardpotentiale sind auf die Standardwasserstoffelektrode (NHE) bezogen. In der Praxis haben sich jedoch leichter handhabbare Referenzelektroden (RE) wie die Ag/AgCl/3N KCl-Elektrode durchgesetzt, die auch in diesem Versuch verwendet wird. Sie besitzt in wässriger Lösung bei pH 7 und 298 K gegenüber der NHE ein Potential von 208 mV.



Cyclovoltammetrische und spektroelektrochemische Messungen (wie in diesem Versuch), bei denen der Arbeitselektrode (AE) ein sich zeitlich änderndes Potential aufgeprägt wird, können mit der oben beschriebenen Zweielektrodenanordnung nicht durchgeführt werden. Sie setzen voraus, dass die fließenden Ströme beliebig klein sind, so dass es in der Elektrolytlösung nicht zu einem Ohmschen Spannungsabfall kommt. Äußerst kleine Ströme (im Nanoampere-Bereich) führen zu sehr langsamer Gleichgewichtseinstellung und sind somit als experimentelle Bedingung nicht brauchbar. Abbildung 3 zeigt eine Dreielektrodenanordnung, mit der genaue Messungen möglich sind, weil der Strom über die AE und die zusätzliche Gegenelektrode (GE) fließt. Die RE bleibt wegen ihres hohen Eingangswiderstandes stromlos. Das in der Lösung vorherrschende Ist-Potential wird zwischen AE und RE abgegriffen und mit Hilfe des Potentiostaten über die GE reguliert, bis die Ist-Spannung dem gewünschten Wert entspricht.

2.2.4 Elektrochemie an Proteinen

Die Methode der direkten Oxidation bzw. Reduktion an einer Elektrode kann auch zur Untersuchung von Redoxproteinen angewendet werden. Allerdings müssen dafür geeignete experimentelle Bedingungen gegeben sein.

Volle Reversibilität der Elektrodenreaktion ist nur gewährleistet, wenn ein direkter Kontakt des Proteins mit der Elektrodenoberfläche vermieden werden kann. Proteine "vergiften" die Metalloberfläche, indem sie dort irreversibel adsorbieren und denaturieren. Der Einsatz geeigneter Reagentien als oberflächenmodifizierende Substanzen („**surface modifier**“ oder "promotoren") bewirkt die Ausbildung einer monomolekularen Schicht auf der Elektrodenoberfläche und damit ihre Abschirmung vom Protein. Der "modifier" muss auf das zu untersuchende Protein abgestimmt sein. Für Proteine mit positiv geladenen Oberflächengruppen wie Cytochrom *c* eignet sich Dithiopyridin Da die redoxaktiven Zentren verschiedener Proteine von außen unterschiedlich zugänglich sind, hängt die Reaktionsgeschwindigkeit auch von der richtigen Orientierung zur Elektrodenoberfläche ab. Diese sollte ebenfalls durch den "modifier" gewährleistet sein. Der Mechanismus des Elektronentransfer an der modifizierten Elektrode ist in Abb. 4 dargestellt.

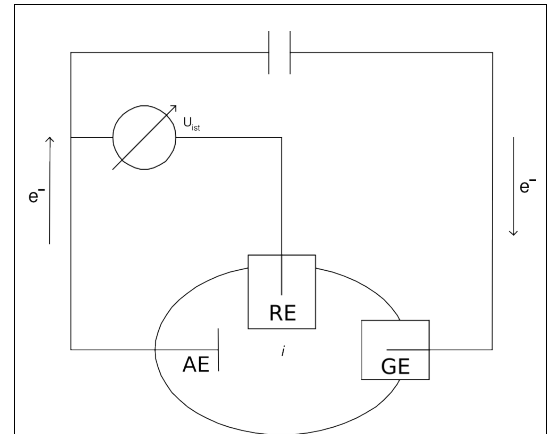


Abbildung 3: Dreielektrodenanordnung: AE: Arbeitselektrode, GE: Gegenelektrode, RE: Referenzelektrode; Gestrichelt sind die Grenzen zwischen den Reaktionsräumen, die zwar einen Ladungs-, aber keinen Stofftransfer zulassen; i: redoxaktive Substanz; Die Pfeile markieren den Stromfluss bei einer oxidativen Reaktion der Substanz i.

Geschwindigkeitsbestimmend bei der Proteinelektrochemie ist in der Regel die Diffusion des Proteins zur Elektrode. Daher kann der Zusatz kleiner, im Vergleich zu den großen Proteinen schnell diffundierender Moleküle eine beträchtlich verkürzte Reaktionszeit bewirken. Sie vermitteln den Elektronenaustausch zwischen Protein und Elektrode und werden daher als "**Mediatoren**" bezeichnet. Sie können sich auch beschränkt im Innern einer Proteinstruktur bewegen und den elektrischen Kontakt zwischen Elektrode und den im Protein verborgenen redoxaktiven Gruppen herstellen. Die Mittelpunktspotentiale der "Mediatoren" müssen den verwendeten Arbeitspotentialen angepasst sein. Cytochrom *c* als kleines, lösliches Protein kann bei geeignet kleinen Diffusionswegen auch ohne Einsatz von "Mediatoren" elektrochemisch reduziert bzw. oxidiert werden.

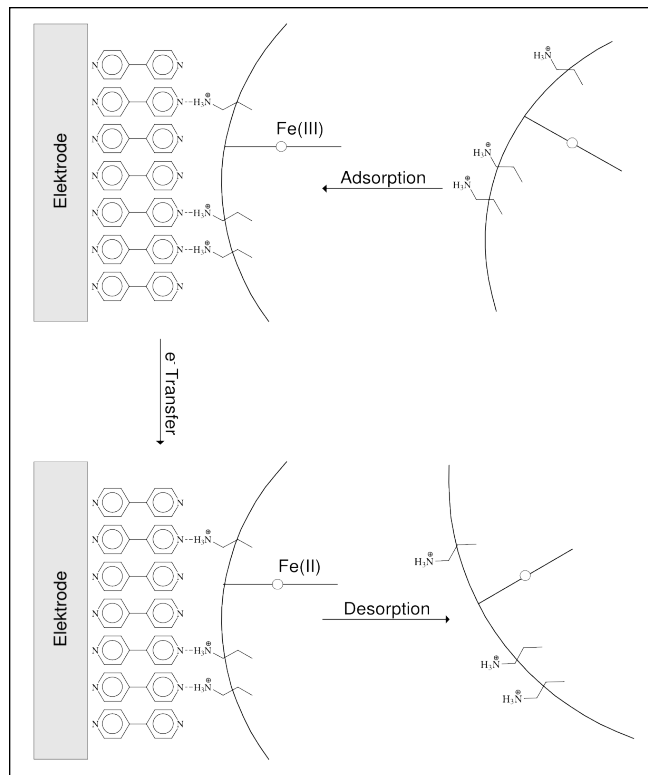


Abbildung 4: Mechanismus des Elektronentransfers bei löslichem Cytochrom *c* mit modifizierter Elektrode.

2.2.5 Potentialtitrationen

Potentialtitrationen dienen zur Bestimmung der charakteristischen Parameter einer Redoxreaktion, wie der Zahl der redoxaktiven Komponenten z , dem Mittelpunktspotential E_m und der Zahl n der übertragenen Elektronen für jede Komponente. Voraussetzung ist das Vorhandensein eines vom Redoxzustand der Komponenten abhängigen Signals (z.B. die Höhe einer Absorptionsbande). Für die Titration wird das an Arbeits- und Gegenelektrode anliegende Potential in kleinen Schritten (10 bis 60 mV) verändert, die Einstellung des Gleichgewichts abgewartet und das entsprechende spektroskopische Signal gemessen. Der potentialabhängige Signalverlauf kann im Fall einer reversiblen Reaktion durch eine oder mehrere Nernst-Kurven angenähert werden, aus denen sich E_m und n ermitteln lassen.

2.2.6 Die spektroelektrochemische Zelle

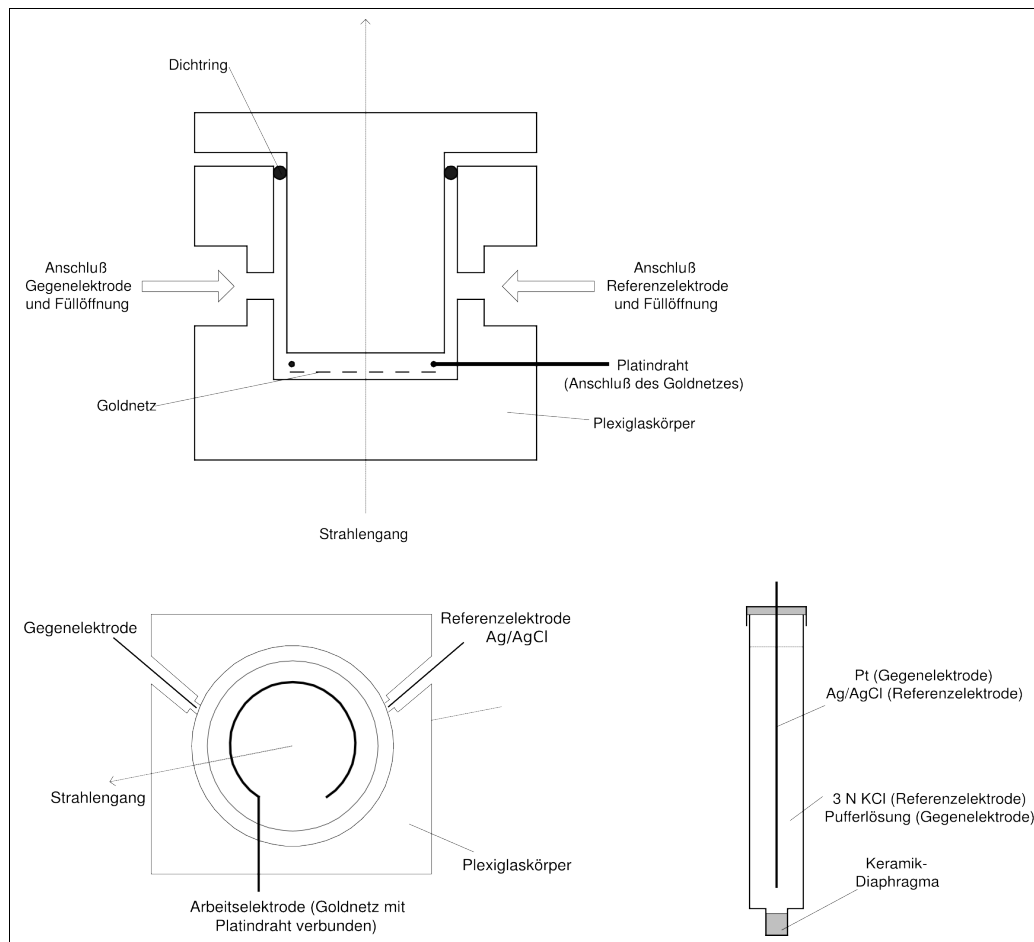


Abbildung 5: Schema der spektroelektrochemischen Zelle: oben Seitenansicht - unten links Aufsicht - unten rechts Aufbau von Gegen- und Referenzelektrode.

Die Dreielektrodenanordnung ist aus Abbildung 5 (unten links) ersichtlich: Die Arbeitselektrode in Form eines Goldnetzes mit 55% optischer Transparenz liegt plan auf einem Plexiglasfenster auf, in das ein Platindraht kreisförmig als Kontakt eingelegt ist. Die Gegenelektrode und die Referenzelektrode werden in den Zellkörper geschraubt. Puffergefüllte Kapillaröffnungen bilden für beide Elektroden die Verbindung zum Zellinnern. Die Schrauböffnungen für die beiden Elektroden dienen auch zum Befüllen und Spülen der Messzelle mit Hilfe einer einschraubbaren Spritze. Die optische Weglänge beträgt 50 μm .

2.3 Spektroskopie

2.3.1 Grundlagen

Spektroskopische Methoden ermöglichen unter anderem die Charakterisierung von Reaktanden und die Untersuchung von Reaktionsverläufen (siehe Versuch **UV/vis Spektroskopie** und **Blitzlichtspektroskopie**).

Grundlage ist das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$A = E = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

A: Absorption [OD] (Optische Dichte), E: Extinktion

I: Intensität des austretenden Lichts, I_0 : Intensität des einfallenden Lichts

ε : Extinktionskoeffizient [l/mol cm]

c: Konzentration [mol/l]

d: Schichtdicke [cm]

Das Porphyringerüst der prosthetischen Gruppe im Cytochrom *c* verändert mit der Oxidation, bzw. Reduktion des Eisenzentrums seine spektroskopischen Eigenschaften. Mit Hilfe der VIS-Spektroskopie lassen sich die beiden Formen des Cytochroms unterscheiden und quantitativ bestimmen.

2.3.2 Elektrochemisch induzierte Differenzspektroskopie

Absorptionsspektren setzen sich aus einer Vielzahl einander überlagernder Banden zusammen, die von sämtlichen durch Strahlungsabsorption verursachten Übergängen im Molekül verursacht werden.

Die Untersuchung von **reaktionsspezifischen Veränderungen** in einem Molekül, in unserem Falle Cytochrom *c*, in Abhängigkeit seines Redoxzustandes erfordert die Erstellung eines **Differenzspektrums**, in dem sich nur die Absorptionsänderungen abbilden, die auf den Wechsel des Redoxzustandes zurückzuführen sind. Prinzipiell ist dies möglich, indem Absorptionsspektren einer Probe (chemisch) oxidierten und einer Probe reduzierten Cytochroms aufgenommen werden und diese nach Subtraktion der Pufferspektren, der Spektren der Oxidations- bzw. Reduktionsmittel und Normierung der Schichtdicken und Konzentrationen miteinander verrechnet werden (siehe Abb. 6a).

Die Kombination von Elektrochemie und Spektroskopie zur **elektrochemisch induzierten Differenzspektroskopie** stellt eine wesentlich genauere und elegantere Lösung für diese Fragestellung dar. Das Protein wird hier elektrochemisch direkt in der optischen Messzelle oxidiert. Nach Verstreichen einer ausreichenden Äquilibrierungszeit wird ein Spektrum des oxidierten Proteins aufgenommen. Anschließend wird an dieselbe Probe ein reduzierendes Potential angelegt und ein Spektrum des reduzierten Proteins aufgenommen. Die beiden so erhaltenen Spektren können ohne weitere Korrektur direkt gegeneinander verrechnet werden, da sich alle Beiträge, die keine reaktionsspezifische Veränderung erfahren haben, gegeneinander aufheben (siehe Abb. 6b).

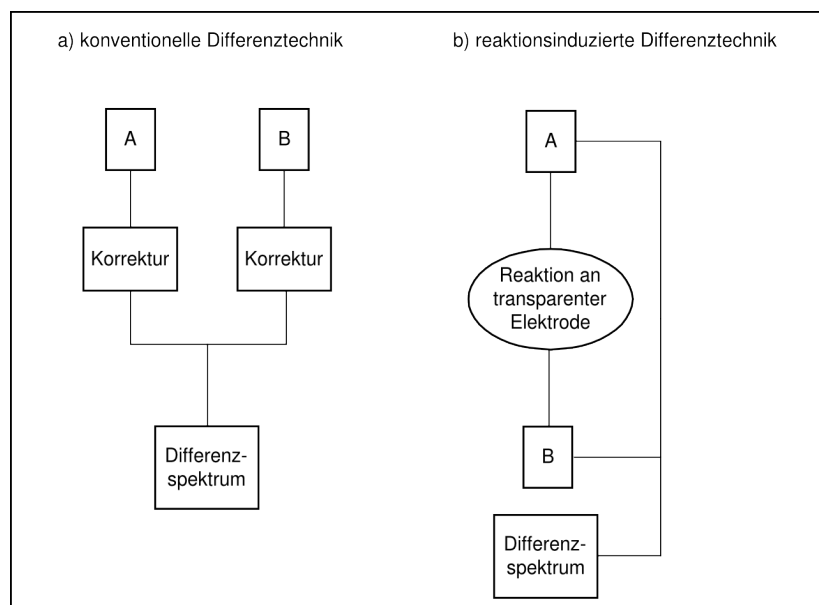


Abbildung 6: Vergleich konventioneller und reaktionsinduzierter Differenzspektroskopie.

2.3.3 UV/vis-Spektroskopie an Cytochromen

Durch Einstrahlung von Licht der geeigneten Wellenlänge können bei Cytochromen vier verschiedene elektronische Übergänge angeregt werden:

- a) *Elektronische Anregung innerhalb der Eisen d-Orbitale*; Diese Übergänge sind in der Regel im Spektrum nicht sichtbar.
- b) π - π^* Übergang der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm;
- c) *Charge Transfer Übergänge* zwischen Orbitalen des Porphyrins und Eisenorbitalen bzw. zwischen den Orbitalen axialer Liganden (Methionin) und Eisenorbitalen; Die Zuordnung dieser Banden war bisher nur bei reduziertem Häm möglich: 600 nm bei high-spin Häm und Banden zwischen 1200 und 1500 nm bei low-spin.
- d) π - π^* Übergänge des Häm: Diese Übergänge können mit einem Vier-Orbital-Modell beschrieben werden, das den Grundzustand S_0 und die drei angeregten Zustände S_1 , S_2 und S_3 umfasst. Die Übergangsdipolmomente liegen in der Ebene des Moleküls entlang der beiden Moleküldiagonalen durch die N-Atome. Der energetisch höchste Übergang $S_0 \rightarrow S_3$ liegt zwischen 390 und 430 nm und wird als Soret-Bande bezeichnet, sie verschiebt sich durch Reduktion bathochrom, d.h. in den längerwelligen Spektralbereich. Zwischen 500 und 600 nm liegt im oxidierten Zustand eine breite Absorptionsbande vor. Reduziertes Cytochrom *c* zeigt bei 520 nm die β -Bande $S_0 \rightarrow S_2$ und bei 550 nm die α -Bande $S_0 \rightarrow S_1$, die zur Charakterisierung der Cytochrome herangezogen wird. Elektronenziehende Substituenten oder höhere Polarität der Umgebung bewirken eine Rotverschiebung der α -Bande (die Elektronenverteilung ist im angeregten Zustand polarer als im Grundzustand, der angeregte Zustand wird im Vergleich zum Grundzustand abgesenkt und der Übergang energieärmer).

3 Quellen und Literatur

B. Speiser, Elektroanalytische Methoden I, *Chemie in unserer Zeit*, **1981**, 1, 21-26, sehr zu empfehlen (innerhalb der Uni online verfügbar: <http://dx.doi.org/10.1002/ciuz.19810150105>)

Haman/Vielstich, Elektrochemie I +II, VCH-Verlag/Taschentext

Biochemielehrbücher (Stryer, Lehninger, Karlson)

Wedler/Atkins

4 Vorbereitung auf den Versuch

1. Grundbegriffe der Elektrochemie, elektrochemische Zellen, Referenzelektroden
2. Grundbegriffe der UV/Vis-Spektroskopie, Lambert-Beer'sches Gesetz, Unterschiede zwischen Einstrahl-, Absorptions- und Differenzspektren
3. Welche biologische Bedeutung hat Cytochrom *c* in der Zelle?
4. Welche spektralen Übergänge der Häm-Gruppe in Cytochrom *c* werden im sichtbaren Spektralbereich beobachtet?
5. Wie kann man aus den redoxabhängigen Absorptionsspektren das Mittelpunktspotential eines Enzyms bestimmen (Nernstgleichung und Lambert-Beer'sches Gesetz)?
6. Wie sollte die Kurve für die Potentialtitration aussehen (d.h. die Auftragung der Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge in Abhängigkeit vom angelegten Elektrodenpotential) und welche Informationen kann man aus ihr entnehmen?
7. Wozu benötigt man die Redoxmediatoren und den Modifier?
8. Zur Vorbereitung gehört unbedingt, dass Sie die Versuchsdurchführung (Abschnitt 5) durchlesen und die einzelnen Schritte des Versuchs nachvollziehen!

5 Versuchsdurchführung

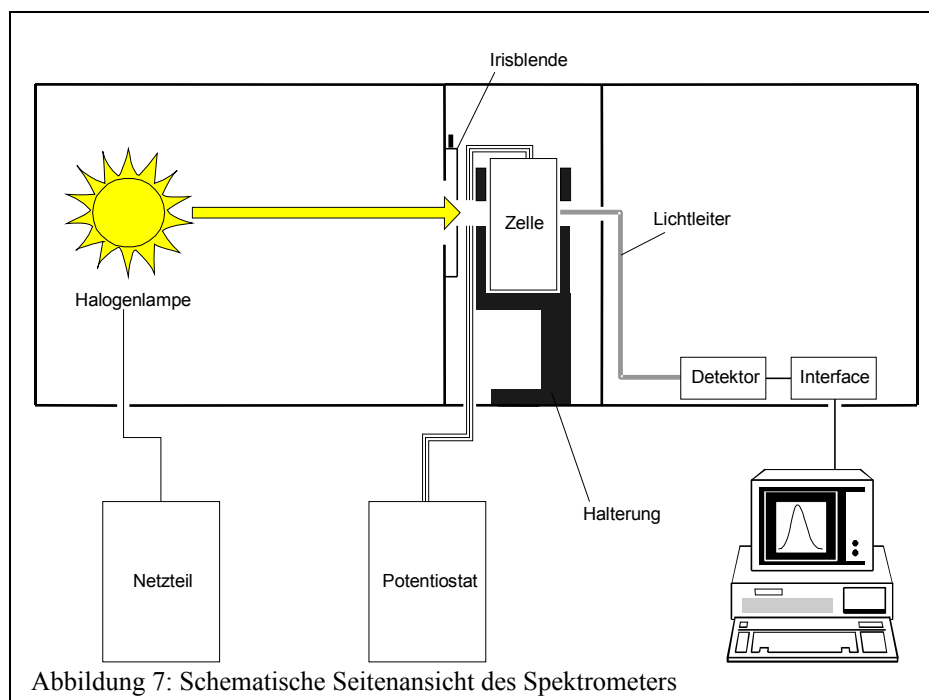
5.1 Versuchsaufbau

Das Spektrometer besteht aus 3 Kammern (Abb. 7). Die linke Kammer enthält die Strahlungsquelle, eine Halogenlampe (12V/20W) deren Emmissionsbereich bei ca. 400 bis 900 nm liegt. Im mittleren, zugänglichen Teil befindet sich die Halterung für die Zelle und eine Irisblende zur Regulierung der eintretenden Lichtintensität. Vom Probenhalter führt ein Lichtleiter zum Detektor in die rechte Kammer des Spektrometers. Bei diesem Einstrahl-spektrometer müssen die Spektren der Probe (I) und der Referenz (I_0) einzeln aufgenommen werden.

Es handelt sich um einen Halbleiterdetektor mit einem 256 Diodenarray. Über ein Interface werden die Signale an einem 12 Bit-AD-Wandler im Computer weitergeleitet und dort verarbeitet. Im Gegensatz zu herkömmlichen Detektoren, bei denen der Wellenlängenbereich mittels eines Monochromators kontinuierlich durchlaufen und entsprechend detektiert wird, kann bei diesem Spektrometer der gesamte, zu vermessende Spektralbereich gleichzeitig aufgenommen werden. Entsprechend der 256 Dioden des Detektors, werden 256 Wellenlängenelemente mit jeweils ca. 3,3 nm spektraler Breite simultan erfasst und ausgelesen (siehe Abbildung 8). Dies bringt gegenüber der dispersiven Technik einen enormen Geschwindigkeitsvorteil. Es ist so möglich, in vergleichbarer Zeit mehrere Spektren zu mitteln und das Signal-Rauschverhältnis zu erhöhen (Multiplex-Vorteil).



Die 3 Elektroden der Zelle sind mit einem Potentiostaten verbunden, mit dem das benötigte Potential angelegt wird.



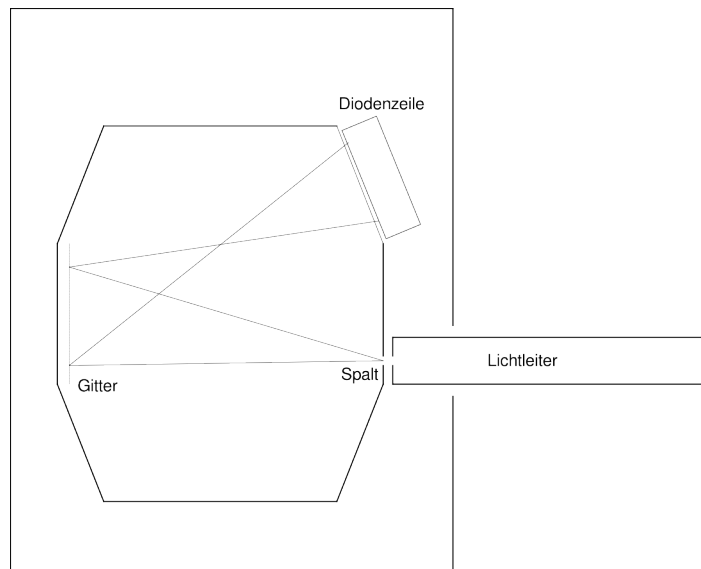


Abbildung 8: Aufbau des Detektors

Bitte halten Sie sich ganz genau an die Versuchsanleitung, jeder Arbeitsgang ist Schritt für Schritt beschrieben!

5.2 Vorbereitung

1. Vor dem Ansetzen der Lösungen Computer und UV-Lampe einschalten!
Einstellungen am Netzteil der Lampe nicht verändern!
2. Netzteil des Potentiostaten einstecken

5.3 Vorbereitung der Proteinlösung und Mediatorlösung:

HANDSCHUHE BENUTZEN !!!

Bitte vergewissern Sie sich über den richtigen Gebrauch von Eppendorfpipetten. Diese haben zwei verschiedene Druckpunkte und dürfen nicht „kopfüber“ mit gefüllter Spitze abgelegt werden! Bitte pipettieren Sie zur Probe Wasser aus einem kleinen Becherglas in ein anderes Gefäß! Der Assistent zeigt Ihnen, wie das geht.

Zur Herstellung der Stammlösung werden in einem Kaliumchlorid-haltigen Phosphatpuffer (100 mM Kalimphosphat, 100 mM Kaliumchlorid, pH 7) folgende Substanzen gelöst (Endvolumen 2,5 ml):

- 1 mM Cytochrom *c* mit einer Molmasse von 12300 g/mol
- 2,5 mM 4,4'-Dithiodipyridin mit einer Molmasse von 220,3 g/mol

Das 4,4'-Dithiodipyridin dient als „Modifier“. Berechnen Sie, wieviel von jeder Substanz abgewogen werden muß, wenn man 2,5 ml Lösung herstellt. Lassen Sie die errechneten Ergebnisse vor dem Einwiegen von einem Assistenten kontrollieren! Beim Auflösen des Proteinpulvers das Gefäß nur vorsichtig invertieren, damit kein Schaum entsteht. Die Lösung muss nach Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Damit der Elektronenaustausch zwischen Protein und Elektrode stattfinden kann, wird ein Mediatormix benötigt, in dem folgende Chemikalien in einer Konzentration von je 6 mM enthalten sind:

- Phenazinthosulfat $M = 334,4 \text{ g/mol}$ ($E_m = -361 \text{ mV vs Ag/AgCl}$)
- Dichlorphenol-Indophenol $M = 290,18 \text{ g/mol}$ ($E_m = 9 \text{ mV vs Ag/AgCl}$)

- N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin $M = 136,2 \text{ g/mol}$ ($E_m = 163 \text{ mV vs Ag/AgCl}$)
- 1,2-Naphtochinon $M = 158,2 \text{ g/mol}$ ($E_m = -63 \text{ mV vs Ag/AgCl}$)

In einen kleinen Eppendorfgefäß mischt man 1000 μl der hergestellten Cytochrom *c*-Lösung und 10 μl der Mediatorlösung, die sie vom Versuchsbetreuer bekommen. Die restliche Cytochrom *c*-Stammlösung und die Mediatorlösung werden wieder in den Kühlschrank zurückgestellt. Die Proteinlösung (Zusammensetzung und Endkonzentrationen ins Protokoll!) wird blasenfrei mit Hilfe einer Kanüle in die Plastikspritze gezogen. Kanüle danach vorsichtig entfernen!

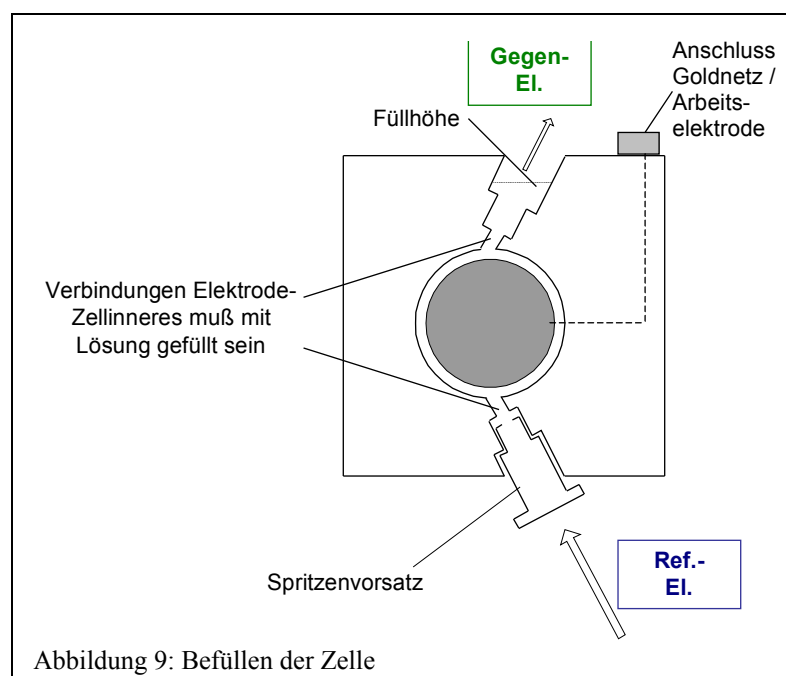
5.4 Befüllen der Messzelle

Überprüfen Sie, ob die Referenzelektrode (weißes Gehäuse) mit 3 M KCl bis zum oberen Rand gefüllt ist. Die Gegenelektrode (durchsichtiges Gehäuse) muss mit dem Messpuffer (100 mM KCl und 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH=7) bis zum oberen Rand gefüllt sein, die Lösungen müssen klar und farblos sein. Elektroden außen mit H_2O dest. abspülen und trocknen.

Vor dem Befüllen der Zelle bitte die Anleitung gut durchlesen und sich die einzelnen Schritte klarmachen!

Die Messzelle lässt sich über die seitlichen Schraubanschlüsse, die auch zur Befestigung der Elektroden dienen, mit Hilfe einer Spritze befüllen. Hierzu wird der Spritzenvorsatz in die Messzelle geschraubt und die mit ca. 0,3-0,4 ml Proteinlösung **blasenfrei** gefüllte Spritze (**ohne Kanüle**) aufgesetzt.

Bei **senkrecht gehaltener** Zelle (Siehe Abbildung 7) kann die Lösung **langsam** von unten nach oben in die Zelle gedrückt werden. Dabei das Ansteigen des Flüssigkeitspegels beobachten. Es ist darauf zu achten, dass in der Zelle möglichst keine Luftblasen verbleiben! Wenn trotz **langsamen** Einspritzens Luftblasen entstehen, können diese eventuell durch mehrmaliges vorsichtiges Anziehen und Drücken der Spritze beseitigt werden. Falls jetzt immer noch große Luftblasen in der Mitte der Zelle verblieben sind, gesamte Proteinlösung in die Spritze zurückziehen, Spritze mit der Einschraubvorrichtung vorsichtig entfernen und Messzelle mit Hilfe der Spritze ausaugen. Füllvorgang wiederholen.



Die Zelle soweit füllen, dass die Probenlösung die gegenüberliegende Öffnung fast bis zum Rand füllt. Es sollten ca. 0,1 ml Lösung in der Spritze verbleiben. Die **Gegenelektrode** in die obere Öffnung einschrauben. **Vorsicht, darauf achten, dass zwischen Elektrode und Zellinnerem keine Luftblase verbleibt!** Eventuell beim Einschrauben überlaufende Lösung abwischen (**Handschuhe!**). Zelle nun umdrehen und Spritze vorsichtig vom

Spritzenvorsatz abziehen. Der Spritzenvorsatz kann jetzt abgeschraubt werden. Diese Öffnung mit einem Teil der in der Spritze verbliebenen Proteinlösung bis kurz unter den Rand füllen und die **Referenzelektrode** einschrauben. **Vorsicht, auch hier darauf achten, dass zwischen Elektrode und Zellinnerem keine Luftblase verbleibt!** Die Verbindung zwischen Zellinnerem und Elektrode (siehe Abbildung 9) muss mit Lösung gefüllt sein!

5.5 Messung

5.5.1 Vorbereitung des Spektrometers

Beim Einschalten des Computers wird das Messprogramm „Mspek“ gestartet. Im unteren Teil des Bildschirms sind 40 Kästchen zu sehen, die im folgenden als Spuren bezeichnet werden. Insgesamt stehen 200 Spuren (entsprechend 200 Kästchen) zur Verfügung. Die Spuren dienen dazu, die Daten der einzelnen Messungen aufzunehmen und sind entsprechend von 1 bis 200 durchnummeriert. Um zu Spuren mit höherer Nummer als 40 zu gelangen, steht der Befehl dwn (down) zur Verfügung, zurück gelangt man mit dem Befehl up. (Befehlsliste im Anhang)

Die folgenden Schritte sind nun auszuführen:

1. **Mit dem Befehl scp werden die Parameter für die Spektrenaufnahme festgelegt:**

Die Parameter werden automatisch abgefragt und gleichzeitig wird ein Wert vorgeschlagen. Falls dieser vom gewünschten Wert abweicht, muss nur der gewünschte Wert eingegeben und mit "Enter" bestätigt werden:

| | |
|------------------|--------|
| scan start | 380.00 |
| scan end | 900.00 |
| Integration time | 40.00 |
| Average count | 40 |

2. Die Spektren werden so im Bereich von 380 bis 900 nm aufgenommen, die einzelnen Signale über einen Zeitraum von 40 ms integriert und 40 Einzelspektren werden zu einem gemittelten Spektrum verrechnet.

3. **Dunkelabgleich :**

Mit dem Befehl sdz (set dark zero) wird das elektronische Dunkelsignal auf Null gesetzt.

4. **Hellabgleich und Aufnahme des Referenzspektrums:**

Die Referenzmesszelle (Plexiglaskörper mit Goldnetz und Pufferlösung ohne Probe, mit einem schwarzen Klebestreifen markiert) wird in die für die Messzelle vorgesehene Halterung in der mittleren Gerätekommer gesteckt, so dass das Goldnetz mit der matten Seite Richtung Lichtquelle (d.h. möglichst nah an den Lichtleiter kommt). Irisblende (siehe Abbildung 7) ganz öffnen. Mit dem Befehl scc (scan continuous) Detektorsignal verfolgen. Irisblende soweit schließen, dass Maximalsignal bei ca. 2.0 V liegt. Mit der Taste esc wird das Referenzspektrum automatisch in die Spur 1 geschrieben. Der Inhalt einer Spur lässt sich graphisch mit dem Befehl plt [Spur] anzeigen. Zum Löschen der graphischen Anzeige steht der Befehl clr zur Verfügung.

Mit dem Befehl **scn [Spur]** werden Einstrahlspektren aufgenommen. Hier wird das Detektorsignal (V) für jedes Wellenlängenelement gemessen. **Um Absorptionsspektren oder Differenzspektren zu erhalten, müssen zwei aufgenommene Einstrahlspektren nach Lambert-Beer miteinander verrechnet werden.** Dazu wird eines der beiden Einstrahlspektren als Referenz definiert, d.h. das Detektorsignal des jeweiligen Wellenlängenelements entspricht in der Berechnung I_0 , der Intensität des ungeschwächten Lichts. Die Referenzspur lässt sich mit dem Befehl dfr[Spur] (define reference) festlegen. Sie wird automatisch in der Anzeige auf dem Schirm mit „R“ (reference) gekennzeichnet. Mit dem Befehl abs[Ausgangsspur][Zielspur] wird das Detektorsignal der „Ausgangsspur“ als I festgelegt und das berechnete Absorptionsspektrum in die „Zielspur“ geschrieben.

Um z. B. das Absorptionsspektrum des scans (Einstrahlspektrums) der Spur x zu erhalten, wobei Spur y das Referenzeinstrahlspektrum enthält, müssen folgende Befehle eingegeben werden: „dfr y“ gefolgt von „abs x z“. Das Absorptionsspektrum befindet sich nun in Spur z.

5.5.2 Einbau und Anschluss der Messzelle

1. Nach Entfernen der Referenzzelle wird die Messzelle in die Halterung gesteckt, so dass die matte Seite des Goldnetzes Richtung Lichtquelle zeigt. (Auf diese Weise kommt die Arbeitselektrode möglichst nahe an den Lichtleiter). Bei **ausgeschaltetem** Potentiostaten (Umlegeswitcher ganz links auf „Line“) werden die Elektroden so angeschlossen, dass die Krokodilklemmen der entsprechenden Farbe (Farbkodierung der Buchsen rechts auf dem Potentiostaten: **Reference (RE)=grün, Counter(GE)=gelb, Working(AE)=schwarz** mit der richtigen Elektrode an der Messzelle verbunden sind.

2. Am Potentiostat den rechten Umlegeschalter auf „**Standby**“ stellen und das Gerät anschalten (Umlegeschal-ter ganz links auf „**On**“). Mit dem Drehknopf ein Potential von -0,3V einstellen. Dabei ist zu beachten, dass ein Skalenteil 2 mV entspricht. Für ein Potential von 300 mV muss der Drehknopf folglich auf 150 gestellt werden. Die vordere Anzeige am Drehknopf zeigt die 100er mV Größenordnung an.
3. Nun den rechten Umlegeschalter „**operate**“ stellen. Ob alles richtig verkabelt ist und keine Luftblasen die elektrische Leitfähigkeit behindern, kann nur anhand der Spektren **bei reduziertem Zustand (negatives Po-tential)** bzw. **oxidiertem Zustand (positives Potential)** kontrolliert werden.

5.5.3 Durchführung der Messungen

Hinweis: zur Auswertung sollten Sie alle Spuren (Nummern) in Ihrem Messprotokoll mit Zustand der Probe vermerken, und ebenso welche Messungen miteinander verrechnet wurden.

1) Ermittlung der Äquilibrierungszeiten für die Oxidation:

- a) In der Zelle liegt ein Potential von -0,3V an, das Protein muss zunächst vollständig reduziert werden. Um zu überprüfen, ob die Reaktion vollständig abgelaufen ist, werden einige Einstrahlspektren im Abstand von 2min. aufgenommen (Spuren 21, 22, ...). Kontrollieren Sie anhand dieser Einstrahlspektren (Befehl `plt [Spur]`), dass das Maximalssignal 2.4 V nicht übersteigt. Andernfalls wäre der Detektor übersteuert! Lassen sie sich nun die Differenzspektren aus zwei aufeinanderfolgenden Einstrahlspektren anzeigen. Als Referenz wird je-weils der direkt zuvor aufgenommene scan verwendet (Befehl z.B.: `dfr 21; abs 22 32; plt 32`). Anhand des **Wellenlängenbereichs um 550 nm** kann überprüft werden, ob die Reaktion abgeschlossen ist. **ΔA sollte in diesem Bereich kleiner ± 3 mOD** sein.
- b) Oxidation des Proteins und Ermittlung der Äquilibrierungszeit für die Oxidation:
Am Potentiostat rechten Umlegeschalter auf „**Standby**“ stellen und ein Potential von +0,3V einstellen. Gleichzeitig mit Umlegen des rechten Schalters auf „**Operate**“ wird die Stoppuhr gedrückt. Alle 2 min. ein Einstrahlspektrum aufnehmen (Spuren 41, 42, usw.) und laufend anhand der Differenzspektren (ablegen in Spuren 51, 52,...), berechnet aus den beiden aufeinander folgenden Einstrahlspektren überprüfen, ob die Oxi-dation vollständig verlaufen ist. **Zeit bis zur vollständigen Oxidation (= Äquilibrierungszeit für die Oxi-dation) notieren!**

Das Protein ist nun wieder **vollständig** zu reduzieren (-0,3 V), die Äquilibrierungszeiten sind vergleichbar mit denen der Oxidation. Währenddessen können bereits die Absorptionsspektren der oxidierten und reduzierten Form ermittelt werden, siehe nächster Punkt. Nicht vergessen ein Spektrum des erneut reduzierten Protein auf-zunehmen!

2) Absorptionsspektren und Differenzspektren:

- a) Zunächst werden mit Hilfe der Spektren aus Punkt 1a) und 1b) **Absorptionsspektren** des voll reduzierten und des voll oxidierten Cytochrom *c* aus den oben ermittelten Daten berechnet. Als **Referenzmessung dient nun Einstrahlspektrum der Referenzzelle**. Dieses wird mit dem Einstrahlspektren des vollständig oxidierten, bzw. reduzierten Proteins verrechnet (Absorptionsspektren in Spur 39 und 40 ablegen). Die beiden Absorpti-onsspektren mit `plt` anzeigen lassen und die Skalierung der Y-Achse ggfs. mit dem Befehl `scl` anpassen. (→ Plot fürs Protokoll)
- b) Das elektrochemisch induzierte **Differenzspektrum** oxidiert-minus-reduziert wird aus dem Einstrahlspektrum des vollständig reduzierten Proteins aus 1a) (als Referenz) und dem des vollständig oxidierten Proteins aus 1b) genauso wie die Absorptionsspektren berechnet. Das elektrochemisch induzierten Differenzspektrum redu-ziert-minus-oxidiert analog aus 1b) (als Referenz) und 1c). Die beiden Differenzspektren in Spur 59 und 60 ablegen und am Bildschirm anzeigen lassen, Y-Achse anpassen (→ Plot fürs Protokoll). Die beiden Spektren sollten spiegelbildlich sein (reversible Reaktion).

3) Redoxtitration:

- a) Führen Sie eine Redoxtitration durch, indem Sie ausgehend vom niedrigsten Potential (Cytochrom *c* ist voll-ständig reduziert) immer höhere Potentiale anlegen und die oben bestimmten Äquilibrierungszeiten abwarten und die entsprechenden Einstrahlspektren aufnehmen. Beginnen Sie bei dem jetzt anliegenden Potential von -0.3V (ablegen in Spur 81). Legen Sie nacheinander -0.20, -0.10, -0.06, -0.02, +0.01, +0.04, +0.07, +0.12, +0.20, +0.3V an und nehmen Sie jeweils ein Einstrahlspektrum auf. Belegen Sie dafür die Spuren 82 bis 95.

Berechnen Sie wie in Abschnitt 1 und 2 die Differenzspektren mit Spur 81 als Referenz. Verwenden Sie dafür die Spuren 102 bis 115.

b) Ermittlung der ΔA -Wert (**Dies kann während der Titration erfolgen**)

Bestimmen Sie anhand der beiden Absorptionsspektren aus Abschnitt 2. die Lage der Soret-, der α - und der β -Bande. Mit dem Befehl **fdy** [Spur] erhalten Sie die entsprechenden Absorptionswerte. Mit den Pfeiltasten können die benachbarten Werte abgefragt werden, um das Maximum der Banden zu bestimmen. Lage und Höhe der Banden bitte ins Protokoll.

Bestimmen Sie für die Soret-, die α - und die β -Bande aller Differenzspektren Spuren 102 bis 115 die ΔA -Werte (die Änderung der Absorption). Diese Tabelle bitte ins Protokoll aufnehmen.

5.5.4 Beenden des Versuchs

Schalten Sie den Potentiostaten ab (Standby, Line, Netzteil ausstecken) und entfernen Sie die Anschlüsse von den Elektroden an der Messzelle. Vor Beendigung des Messprogramms müssen die Daten ins txt-Format transferiert werden. Dazu mit der höchsten Nummer/Spur (Bsp. 95) der Spektren in MSpek eingeben:

```
for i=1 to 95 do sva i i
```

Nach Beendigung des Programms MSpek mit dem Befehl **end sund** auf der DOS-Ebene die Messungen im Textformat mit den Bezeichnungen <Nr.>.asc unter C:\MSpek zu finden. Vom Betreuer erhalten Sie eine Diskette, mit der die Daten transferiert werden können (Diskette bitte wieder zurückgeben).

Computer und UV/vis-Lampe ausschalten. Netzteil ausstecken.

Messzelle entnehmen, Elektroden abschrauben. Spritze und Kanüle ausspülen. Zelle mit Hilfe einer Spritze trockensaugen und mindestens 3 Mal mit ca 0.3 ml H₂O dest. (**keinesfalls Aceton verwenden!**) füllen (mit gespülter Plastikspritze) und trockensaugen. Kontrollieren Sie den Inhalt der beiden Elektroden. Falls Protein in die Elektroden diffundiert ist, sieht die Lösung trüb oder gefärbt aus und der entsprechende Inhalt (3 N KCl bzw. Puffer mit KCl, **nicht verwechseln**) muss erneuert werden. Das gleiche gilt für die Lösungen in den Gefäßen, in denen die Elektroden aufbewahrt werden. Elektroden außen abspülen und in den entsprechenden Behältern lagern. Achten Sie auf Sauberkeit und Vollständigkeit aller benutzten Geräte.

6 Auswertung

Anhand der Absorptionsbanden des Cytochrom *c* kann die Konzentrationsabhängigkeit der oxidierten bzw. reduzierten Form vom Potential verfolgt werden.

1. Ganz kurze Zusammenfassung des Versuchsablaufs, geben sie alle eingesetzten Substanzen und Konzentrationen an.
2. Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse und Beschreibung der erhaltenen Spektren.

mindestens die folgenden Spektren sollten Bestandteil des Protokoll sein:

- a) Absorptionsspektren des reduzierten und oxidierten Zustands bezogen auf das Pufferspektrum, incl. Zuordnung der Soret-, der α - und der β -Bande.
 - b) Redox-Differenzspektren reduziert-minus-oxidiert und oxidiert-minus-reduziert incl. korrekter Zuordnung in der Zeichnung.
 - c) Redox-Differenzspektren oxidiert-minus-reduziert der Titration, evtl. einen Spektralbereich herausgreifen.
3. Graphische Darstellung der Nernstkurven (siehe Formel 3.5) mit den in Abschnitt 4.5.3 unter Punkt 4 ermittelten Absorptionswerten mindestens der α -Bande. Gegebenenfalls auch der Soret- und der β -Bande. Auftragung des Potentials (x-Achse) gegen die Absorptionsänderung (y-Achse). ΔA -Werte können direkt übernommen werden (warum?). Bestimmen Sie E_m des Cytochrom *c* aus allen drei Kurven (wie?). Diskutieren Sie die Zuverlässigkeit der einzelnen Ergebnisse; berücksichtigen Sie dafür die Signalgröße einerseits und die Empfindlichkeit des Detektors und der Lampenintensität im entsprechenden Wellenlängenbereich andererseits. Vergleich der ermittelten E_m mit Literatur-Werten (siehe Bücher der Biochemie). Bei Darstellung der Nernstkurve achten Sie bitte auf die Sichtbarkeit der einzelnen Punkte. Eine geeignete Nernstkurve kann per Mathematik-Software oder von Hand eingepasst werden. Diskutieren Sie alle möglichen Fehlerquellen.

7 Anhang: Befehle in Mspek

Jeder Befehl muss mit der Return-Taste abgeschlossen werden!!

| | |
|---------------------------------------|---|
| abs [Ausgangspur] [Zielspur] | Absorptionsspektrum/Differenzspektrum bilden. Als I_0 dient Referenzspur (\rightarrow dfr) |
| clr | Graphik löschen |
| cpy [Ausgangspur] [Zielspur] | Spur kopieren |
| del [Spur] | Spur löschen |
| dfr [Spur] | Spur als Referenz setzen |
| dwn | Spuranzeige weiter |
| edz | Dunkelwert auf Null setzen |
| end | Programm verlassen (Wiederaufruf des Programms mit c:\mspek\sp21.exe) |
| fdy [Spur] | Abfragen des Y-Wertes (Absorption) von X einer graphischen Darstellung (Pfeiltasten zum Anzeigen der benachbarten Werte). Die gewünschte Wellenlänge kann auch direkt mit der Eingabe X[X-Wert]; Abbruch mit esc. |
| plt [Spur] | Graphische Darstellung der Spur |
| prn | Graphik drucken, automatische Abfrage: Titel eingeben, Notes mit Return übergehen. |
| scs [Spur] | Kontinuierliches Scannen, Abbruch und Speichern des letzten scans auf die angegebene Spur mit der Taste esc |
| scl | Grafik skalieren (<i>Punkt statt Komma als Dezimaltrenner; keine zu großen Zahlen eingeben, sonst kann die Software abstürzen!</i>) |
| scn [Spur] | scannen |
| scp | Scanparameter einstellen |
| svt | Speichern der Spuren: 1)Datum 2)Unterverzeichnis 3)Spuren |
| up | Spuranzeige zurück |
| und [Spur] | gelöschte Spur wiederherstellen |
| blc [Ausgangspur] [Zielspur] [X-Wert] | Basislinienkorrektur, Y-Wert wird bei X auf 0 gesetzt. |

weitere wichtige Befehle:

MSpek: alle Spuren von Diskette laden, z.B. aus dem Verzeichnis A:\Mai18-05\1\:

```
ldt
1
all
```

MSpek: alle Messungen/Spuren von Festplatte reinladen (undo all):

```
und all
```

DOS-Befehle: kopieren aller Dateien mit Endung .asc auf Diskette:

```
copy *.asc a:\
```

(Es kann vorkommen, dass von vorangegangenen Experimenten Spuren dabei sind, die Sie nicht belegt hatten)