

Abbildung 3. Geometrieoptimierte Struktur von **7** und graphische Darstellung der Spindichteverteilung. Ausgewählte Bindungslängen [Å] und Winkel [°]: P1-P2 2.18, P1-C8 1.89, P2-C3 1.88, P2-C7 1.89; P2-P1-C8 96.1, C3-P2-P1 115.3, C7-P2-P1 105.9, C3-P2-C7 116.3.

Bindungslänge liegt zwischen der einer Einfach- und der einer Doppelbindung (Bindungsordnung 1.5), und das dreifach koordinierte Stickstoffzentrum liegt in einer planaren Koordinationssphäre. Im Unterschied dazu ist die P-P-Bindung in **7** fast so lang (2.18 Å) wie eine P-P-Einfachbindung (ca. 2.22 Å), und das Phosphorzentrum P2 ist pyramidal umgeben. Bemerkenswerterweise entspricht die Summe  $\Sigma$  der Bindungswinkel an P2 ( $\Sigma(P2) = 337.5^\circ$ ) recht genau der Mitte zwischen derjenigen, die für ein planares Phosphorzentrum wie das in **4** ( $\Sigma(P2) = 360^\circ$ ) und für ein „normal“ pyramidalisiertes Phosphorzentrum in ähnlicher Umgebung wie das in **13** ( $\Sigma(P) = 315.9^\circ$ ) bestimmt wurde. Die Winkelsumme  $\Sigma(P2)$  stimmt gut mit der Winkelsumme in den Niecke-Singulett-Diradikalen 1,3-Diphosphacylobutan-2,4-diyl [RPCR<sup>1</sup>]<sub>2</sub> ( $\Sigma(P) = 337-341^\circ$ )<sup>[19]</sup> überein, und wie in diesen, kann ein gewisses Ausmaß an  $\pi$ -Donation vom Phosphorzentrum, hier P2, zum elektronenarmen Zentrum, hier P1, angenommen werden. Die Struktureigenschaften von **7** bedingen eine ausgeprägte Spinlokalisierung auf P1, während im Stickstoffanalogon DPPH das ungepaarte Elektron nahezu gleichmäßig über beide Stickstoffzentren delokalisiert ist. Wie erwartet ist die ESR-Anisotropie von **7** wesentlich stärker ausgeprägt als die der Hydrazyle. Für **7** sind die Übergänge bei niedrigem und hohem Feld 42 mT voneinander getrennt, wenn das Magnetfeld  $H_0$  in Richtung des magnetischen  $3p_z$ -Orbitals von P1 orientiert ist, und nur 13 mT, wenn  $H_0$  senkrecht dazu steht. Die damit verbundene Anisotropie (820 MHz) – man vergleiche hiermit die viel kleineren Anisotropien von DPPH (230 MHz) oder von Nitroxiden (150 MHz) – zeigt, dass Diphosphanylradikale sehr gut für das Studium schneller Molekularbewegungen geeignet wären.

Freie Diphosphanylradikale sind viel stabiler als bisher angenommen wurde und können isoliert werden. Die Aufklärung ihrer prinzipiellen strukturellen und physikalischen Eigenschaften und ihrer Zersetzungswege wird helfen, andere Substitutionsmuster zu entwerfen, mit dem Ziel, noch stabilere Radikale des Typs [RR<sup>1</sup>P-PR<sup>2</sup>]<sup>•</sup> zu erhalten.

Eingegangen am 8. September 2000 [Z15781]

- [1] A. R. Forrester, J. M. Hay, R. H. Thomsen, *Organic Chemistry of Stable Free Radicals*, Academic Press, New York, **1968**.
- [2] „Spin Labeling“: L. J. Berliner, *Biological Magnetic Resonance*, Vol. 14, Plenum, New York, **1998**.
- [3] S. F. Nelsen in *Free Radicals*, Vol. 2 (Hrsg.: J. Kochi), Wiley, New York, **1973**.
- [4] G. Chachaty, C. Mathieu, A. Mercier, P. Tordo, *Magn. Reson. Chem.* **1998**, 36, 46.
- [5] Langlebige (R<sub>2</sub>N)<sub>2</sub>P<sup>•</sup>-Radikale in Lösung: M. J. S. Gynane, A. Hudson, M. F. Lappert, P. P. Power, H. Goldwhite, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1980**, 2428.
- [6] Nachweis von Diphosphanylen R<sub>2</sub>PPR<sup>•</sup> in Lösung: a) B. Cetinkaya, A. Hudson, M. F. Lappert, H. Goldwhite, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**, 609; b) M. Yoshifuji, K. Shibayama, N. Inamoto, T. Watanabe, *Chem. Lett.* **1983**, 585.
- [7] Nachweis von Diphosphanylen R<sub>2</sub>PPR<sup>•</sup> im Gastgitter von bestrahlten Mes<sup>•</sup>P=PMe<sub>3</sub>-Kristallen: a) M. Cattani-Loriente, M. Geoffroy, *J. Chem. Phys.* **1989**, 91, 1498; b) M. Geoffroy, *Recent Res. Devel. Phys. Chem.* **1998**, 2, 311.
- [8] Über ein in Lösung stabiles Radikalanion von *p*-Phosphachinon berichteten: S. Sasaki, F. Murakami, M. Yoshifuji, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 351; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 340.
- [9] Ein bei Raumtemperatur stabiles 1,3-Diphosphaaallylradikal wurde beschrieben: Y. Canac, A. Bacereido, W. W. Schoeller, D. Gimes, G. Bertrand, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7579.
- [10] S. Loss, C. Widauer, H. Grützmacher, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 3546; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3329.
- [11] V. L. Pardini, L. Roullier, J. H. P. Utley, A. Webber, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1981**, 1520.
- [12] K. Kuwata, D. H. Geske, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 2197.
- [13] D. J. Brauer, F. Bitterer, F. Dörrenbach, G. Hessler, O. Stelzer, C. Krüger, F. Lutz, *Z. Naturforsch. B* **1996**, 51, 1183.
- [14] A. H. Cowley, J. E. Kilduff, N. C. Norman, M. Pakulski, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1986**, 1801.
- [15] M. Yoshifuji, I. Shima, N. Inamoto, K. Hirotsu, T. Higuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 4597.
- [16] J. R. Morton, K. F. Preston, *J. Magn. Reson.* **1978**, 30, 577.
- [17] E. J. Baerends, D. E. Ellis, P. Ros, *Chem. Phys.* **1973**, 2, 41.
- [18] G. te Velde, E. J. Baerends, *J. Comput. Phys.* **1992**, 99, 84.
- [19] a) E. Niecke, A. Fuchs, F. Baumeister, M. Nieger, W. W. Schoeller, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 640; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 555; b) E. Niecke, A. Fuchs, M. Nieger, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 640; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3028.

## Elektronentransferdynamik von adsorbiertem Cytochrom *c* auf selbstorganisierten Monoschichten – eine Untersuchung mit zeitaufgelöster oberflächenverstärkter Resonanz-Raman-Spektroskopie\*\*

Daniel H. Murgida und Peter Hildebrandt\*

Selbstorganisierte Monoschichten (self assembled monolayer, SAM) aus Alkanthiolderivaten eröffnen vielfältige Möglichkeiten zur Immobilisierung von Redoxproteinen auf

[\*] Prof. P. Hildebrandt, D. H. Murgida  
Max-Planck-Institut für Strahlchemie  
Stiftstraße 34–36, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)  
Fax: (+49) 208-306-3951  
E-mail: hildebrandt@mpi-muelheim.mpg.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Volkswagen-Stiftung und der Alexander-von-Humboldt-Stiftung gefördert.

Metallelektroden.<sup>[1]</sup> In den letzten Jahren ist das Interesse an solchen Anordnungen in der (Nano-)Biotechnologie stark angestiegen. Insbesondere die aktuelle und potentielle Bedeutung immobilisierter Enzyme als Biosensoren,<sup>[2]</sup> in bioelektronischen Systemen<sup>[3]</sup> oder biokatalytischen Zellen<sup>[4]</sup> hat zahlreiche experimentelle Arbeiten in diesem Bereich initiiert. Dabei stellt die Entwicklung spezifischer katalytischer Funktionen und die Optimierung der Effizienz dieser Systeme eine Herausforderung dar, deren Bewältigung eine detaillierte Charakterisierung der strukturellen, dynamischen und funktionellen Eigenschaften der redoxaktiven Adsorbate erfordert. Diese Aufgabe erfordert eine hohe Empfindlichkeit und Selektivität der methodischen Ansätze. In den meisten Fällen werden mikroskopische und elektrochemische Techniken wie die Kraftfeldmikroskopie und die Cyclovoltammetrie (CV) eingesetzt. Diese Methoden liefern allerdings keine Informationen über die molekulare Struktur der am Redoxprozess beteiligten Spezies. In dieser Hinsicht ist die zeitaufgelöste oberflächenverstärkte Resonanz-Raman- (surface enhanced resonance Raman, SERR) Spektroskopie eine viel versprechende Alternative, da sie selektiv das Schwingungsspektrum der Redoxzentren ausschließlich der immobilisierten Spezies abfragt und damit zur Analyse der molekularen Struktur und Dynamik der adsorbierten Enzyme geeignet ist.<sup>[5]</sup>

Die zeitaufgelöste SERR-Spektroskopie an Redoxproteinen war bislang auf unbeschichtete Ag-Elektroden beschränkt, die allerdings angesichts der möglichen Denaturierung der direkt adsorbierten Proteine nur von begrenzter Anwendbarkeit für die Untersuchung biologischer Systeme sind. In dieser Arbeit haben wir die zeitaufgelöste SERR-Spektroskopie erstmals zur Analyse des heterogenen Elektronentransfers (ET) eines Proteins eingesetzt, das auf einer SAM-beschichteten Ag-Elektrode adsorbiert wurde. Dazu wurde mit Cytochrom *c* (Cyt-*c*) ein Redoxprotein gewählt, das bereits mit verschiedenen elektrochemischen Techniken wie CV, elektrochemischen Impedanzmessungen und Elektroreflektionsspektroskopie untersucht wurde.<sup>[6–8]</sup>

Nach dem elektrochemischen Aufrauen der Ag-Elektrode<sup>[5]</sup> wurden SAMs aus 11-Mercaptoundecansäure (11-MUDA; Aldrich) gemäß publizierten Vorschriften präpariert.<sup>[9]</sup> Zur Adsorption des Cyt-*c* wurde die beschichtete Elektrode ca. 30 Minuten in eine Lösung getaucht, die 2  $\mu\text{M}$  des gereinigten Proteins (Pferdeherz, Sigma) sowie 12.5 mM KCl und 12.5 mM Phosphatpuffer enthielt. Anschließend wurde die Elektrode zur Entfernung ungebundenen Proteins mit einer Lösung dieses Puffers gespült und in die Messzelle eingesetzt, die eine Cyt-*c*-freie Lösung der gleichen Elektrolytzusammensetzung enthielt. Für die Messung der SERR-Spektren (Anregung bei 413 nm) wurde eine selbstgebaute rotierende Zylinderelektrode eingesetzt, um eine laserinduzierte Desorption und Denaturierung des Proteins zu vermeiden.<sup>[5b]</sup> In den zeitaufgelösten Experimenten wurden die SERR-Spektren im Zeitintervall  $\Delta t$  (in der Regel 500  $\mu\text{s}$ ) nach einer Verzögerungszeit  $\delta$  relativ zu einem schnellen Potentialsprung vom Anfangspotential  $E_i$  zum Endpotential  $E_f$  abgefragt. Eine detaillierte Beschreibung der Methode und des experimentellen Aufbaus findet sich bei Wackerbarth et al.<sup>[5b, 10]</sup>

Die Intensität der stationären SERR-Spektren des an beschichteten Elektroden gebundenen Cyt-*c* war lediglich um den Faktor 2 kleiner als bei unbeschichteten Elektroden. Dieser Befund, der sich mit früheren Resultaten deckt,<sup>[11, 12]</sup> bedeutet, dass trotz der abstandsabhängigen Abschwächung des Verstärkungseffektes die Messung qualitativ hochwertiger SERR-Spektren noch bei einem Abstand von ca. 19 Å zwischen Cyt-*c* und der Elektrode möglich ist. Im Laufe der Experimente nahm die SERR-Intensität um weniger als 10 % ab, was darauf hinweist, dass Cyt-*c* über seine lysinreiche Domäne, in deren Zentrum sich der exponierte Teil des Häm-Proteins befindet, eine effiziente elektrostatische Bindung mit den Carboxylatgruppen der SAM eingeht.<sup>[13]</sup> Die Analyse der SERR-Spektren konzentrierte sich auf den Bereich zwischen 1300 und 1700  $\text{cm}^{-1}$ , der die Schwingungsbanden des Häms beinhaltet, deren Frequenzen charakteristisch für die verschiedenen Oxidations-, Spin- und Koordinationszustände von Cyt-*c* sind. Damit ist dieser Bereich des Spektrums von besonderer Bedeutung für die Identifizierung von solchen Cyt-*c*-Spezies, deren aktive Zentren sich strukturell unterscheiden. Abgesehen von einer geringen Bandenverbreiterung sind die bei +0.05 und –0.4 V<sup>[14]</sup> gemessenen SERR-Spektren praktisch identisch mit den Resonanz-Raman(RR)-Spektren von oxidiertem bzw. reduziertem Cyt-*c* in Lösung. Das bedeutet, dass bei Bindung an die mit 11-MUDA-beschichtete Elektrode keine Strukturänderungen der Häm-Tasche auftreten. Dieser Befund unterscheidet sich von den Ergebnissen an unbeschichteten Ag-Elektroden, wo elektrostatische Wechselwirkungen mit dem adsorbierten Cyt-*c* zu einem potentialabhängigen Konformationsgleichgewicht zwischen dem nativen Zustand B1 und einem neuen Zustand B2 führen, der sich durch den Verlust des axialen Met-80-Liganden und ein stark negativ verschobenes Redoxpotential auszeichnet.<sup>[5b, 13, 15]</sup> Daher ist die Analyse des Redoxprozesses von Cyt-*c* an der beschichteten Ag-Elektrode erheblich vereinfacht, indem nur zwei spektroskopisch unterschiedliche Spezies berücksichtigt werden müssen, d. h. die reduzierte und die oxidierte Form von nativem Cyt-*c* (B1). Somit liefert die Überlagerung der Komponentenspektren<sup>[5]</sup> dieser beiden Spezies eine eindeutige und sehr gute Anpassung aller im Potentialbereich von +0.05 bis –0.4 V gemessenen SERR-Spektren, sodass die Potentialabhängigkeit des Redoxgleichgewichtes des adsorbierten Cyt-*c* mit hoher Genauigkeit bestimmt werden kann. Die Nernst-Auftragung zeigt eine sehr gute lineare Korrelation mit einer Steigung von  $n = 0.96$ . Für das Redoxpotential wurde ein Wert von –0.031 V bestimmt, der um ca. 40 mV negativer ist als das Redoxpotential von Cyt-*c* in Lösung.<sup>[16]</sup> Dieser Unterschied kann auf den Potentialabfall über die Monoschicht und der daraus resultierenden Potentialerniedrigung am Ort des Redoxzentrums zurückgeführt werden.<sup>[5c, 17]</sup>

Die zeitaufgelösten SERR-Spektren wurden nach Potentialsprüngen zum Endpotential von –0.031 V, d. h. zum Redoxpotential, bei Verzögerungszeiten von 500  $\mu\text{s}$  bis 40 ms gemessen. Als ein Beispiel zeigt Abbildung 1 das nach einem Potentialsprung von  $E_i = -0.074 \text{ V}$  mit  $\delta = 8.5 \text{ ms}$  gemessene zeitaufgelöste SERR-Spektrum zusammen mit den stationären SERR-Spektren bei  $E_i$  und  $E_f$ . Auch in den zeitaufgelösten Experimenten weisen die SERR-Spektren

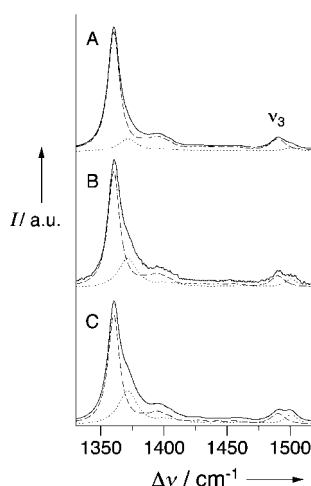


Abbildung 1. SERR-Spektren von Cyt-c, adsorbiert auf einer mit 11-MUDA beschichteten Ag-Elektrode und gemessen bei einem Potentialsprung von  $E_i = -0.074$  V nach  $E_f = -0.031$  V. A) und C) sind die stationären SERR-Spektren, gemessen bei  $E_i$  bzw.  $E_f$ . B) zeigt das zeitaufgelöste SERR-Spektrum nach einer Verzögerungszeit von 8.5 ms nach dem Potentialsprung. Die gestrichelten und gepunkteten Linien geben die Komponentenspektren der reduzierten bzw. oxidierten Form von Cyt-c wieder.

nur Beiträge der reduzierten und oxidierten Formen von nativem Cyt-c auf, sodass die Komponentenspektren dieser beiden Spezies eine konsistente Anpassung an die zeitaufgelösten SERR-Spektren im gesamten Zeitbereich ermöglichen. Die zeitabhängigen Konzentrationsänderungen können daher auf der Grundlage eines einstufigen Relaxationsprozesses ausgewertet werden, der sich auf den heterogenen ET zwischen dem adsorbierten Cyt-c und der Elektrode bezieht. In der Tat ergibt eine halblogarithmische Auftragung der Abweichungen von den Gleichgewichtskonzentrationen als Funktion von  $\delta$  eine Gerade mit einer sehr guten Korrelation und einem Achsenabschnitt, der nahe am theoretischen Wert von null liegt (Abbildung 2a). Die

Bestimmung der formalen

heterogenen Geschwindigkeitskonstante (bei  $E_f = E^0$ ) aus der Steigung der Geraden führt zu einem Wert von  $43 \text{ s}^{-1}$ , der etwas kleiner als die Konstanten ist, die aus elektrochemischen Experimenten an SAM-beschichteten Au-Elektroden bestimmt wurden ( $60\text{--}72 \text{ s}^{-1}$ ).<sup>[6d, 8]</sup>

Werden größere Potentialsprünge mit negativeren Anfangspotentialen  $E_i$  auf  $E_f = E^0$  durchgeführt, wird die Dyna-

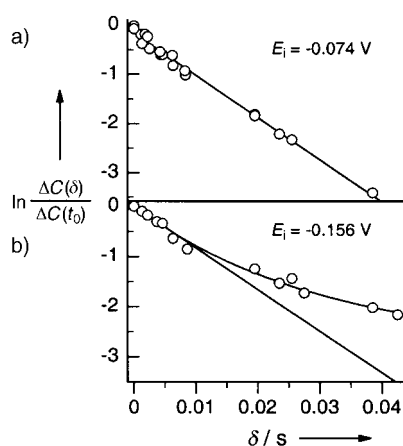


Abbildung 2. Halblogarithmische Darstellung der aus den SERR-Spektren bestimmten Konzentrationsänderungen des reduzierten Cyt-c als Funktion der Verzögerungszeit  $\delta$ .  $\Delta C(\delta)$  und  $\Delta C(t_0)$  bezeichnen die Abweichungen von den Gleichgewichtswerten für  $E_f = -0.031$  V bei  $t = \delta$  bzw. bei  $t = 0$ . Das obere Diagramm (a) bezieht sich auf die Daten für den Potentialsprung von  $E_i = -0.074$  V auf  $E_f = E^0$ , das untere (b) für den Sprung von  $E_i = -0.156$  V auf  $E_f = E^0$ .

mik des ET komplexer wie in Abbildung 2b für  $E_i = -0.156$  V gezeigt ist. Während bei Verzögerungszeiten von weniger als 7 ms die halblogarithmische Auftragung der Konzentrationsänderungen durch eine Gerade mit derselben Steigung wie für  $E_i = -0.074$  V beschrieben werden kann (Abbildung 2a), tritt bei längeren Verzögerungszeiten eine deutliche Abweichung vom linearen Verlauf auf.<sup>[18]</sup> Diese Abweichung weist darauf hin, dass sich bei größeren Potentialsprüngen ein zweiter und relativ langsamer Nicht-Faraday-Prozess mit dem ET des adsorbierten Cyt-c überlagert. Da aufgrund der Analyse der SERR-Spektren und des idealen Nernst-Verhaltens Konformationsübergänge, die mit einer Strukturänderung des Redoxzentrums und damit einer Verschiebung des Redoxpotentials verknüpft sind, ausgeschlossen werden können, wird gefolgert, dass im adsorbierten Cyt-c ein potentialabhängiges Gleichgewicht zwischen zwei Spezies induziert wird, die sich ausschließlich in ihrer ET-Kinetik unterscheiden. Dieser Unterschied kann in unterschiedlichen Orientierungen des Häms relativ zur SAM begründet sein, die ihrerseits aus der Adsorption des Cyt-c über verschiedene Lysinreste in der Bindungsdomäne resultieren können. Da dieser Bereich des Proteins ca. 10 Lysinreste enthält,<sup>[19]</sup> sind Orientierungsänderungen auch ohne Variation des Abstandes des Redoxzentrums von der Elektrode leicht möglich.<sup>[20]</sup> Dieser Interpretation zufolge könnte Cyt-c bei Potentialen nahe  $E^0$  überwiegend in einer für einen schnellen ET geeigneten Orientierung gebunden sein, während bei negativeren Potentialen eine Orientierung thermodynamisch favorisiert wird, die mit einem langsameren ET verknüpft ist. Die letztgenannten Spezies sollten folglich bei negativen Anfangspotentialen  $E_i$  überwiegen. Dementsprechend spiegelt die langsame Phase der Relaxationskinetik (Abbildung 2b) entweder direkt den ET dieser Spezies oder deren Reorientierung, gefolgt von einem schneller ET, wider. Bei kleinen Potentialsprüngen ist die Gleichgewichtsverteilung zwischen beiden Populationen bei  $E_i$  und  $E_f$  wahrscheinlich sehr ähnlich, sodass der Relaxationsprozess gut durch eine einzige Exponentialfunktion beschrieben werden kann (Abbildung 2a).<sup>[21, 22]</sup>

Gemäß dieser Interpretation ist zu erwarten, dass bei Potentialen oberhalb von  $E^0$  alle adsorbierten Cyt-c-Moleküle in der für den ET günstigen Orientierung vorliegen. Diese Schlussfolgerung wird durch Messungen mit großen Potentialsprüngen von  $E_i = +0.1$  V zu  $E^0$  bestätigt. In diesem Fall sind die ET-Kinetiken monphasisch mit einer Geschwindigkeitskonstanten von  $39 \text{ s}^{-1}$ , die sehr gut mit der übereinstimmt, die für kleine Potentialsprünge von negativen Anfangspotentialen ermittelt wurde.

Im Unterschied zur zeitaufgelösten SERR-Spektroskopie können elektroaktive und -inaktive Spezies mit Hilfe der CV nicht identifiziert und unterschieden werden, sodass die Anwendbarkeit dieser Methode für die Analyse der ET-Kinetik von Adsorbaten fraglich oder zumindest begrenzt ist.<sup>[23]</sup> Allerdings kann sich die Kopplung von Faraday- und Nicht-Faraday-Prozessen indirekt in den elektrochemischen Experimenten widerspiegeln. So wurde die Peakverbreiterung in den Cyclovoltammogrammen, die für auf SAM-beschichteten Au-Elektroden adsorbiertem Cyt-c beobachtet wurde, auf eine Verteilung kinetischer oder thermodynami-

scher Parameter des Redoxprozesses zurückgeführt.<sup>[6a-c]</sup> Auf der Grundlage der hier diskutierten zeitaufgelösten SERR-Experimente ist die Folgerung nahe liegend, dass es sich dabei in erster Linie um den elektronischen Kopplungsparameter handelt, da dieser empfindlich von der Orientierung des adsorbierten Cyt-c abhängen sollte, auch wenn die verschiedenen möglichen Orientierungen wahrscheinlich nicht in der ET-Entfernung variieren.<sup>[20]</sup> Eine Verteilung der Reorganisationsenergien oder Redoxpotentiale, wie sie von Bowden et al. vorgeschlagen wurde,<sup>[6b]</sup> kann hingegen ausgeschlossen werden, da Unterschiede in diesen Parametern sich in der Struktur der Redoxzentren bemerkbar machen müssen. Die SERR-Spektren zeigen jedoch keine Anzeichen für solche strukturellen Heterogenitäten des gebundenen Cyt-c (siehe oben).

Die Ergebnisse dieser Arbeit illustrieren die prinzipiellen Vorteile der zeitaufgelösten SERR-Spektroskopie, die geeignet ist, zeitabhängige Prozesse adsorbierter Redoxproteine direkt und selektiv zu verfolgen und dabei gleichzeitig Informationen über die Struktur der aktiven Zentren der beteiligten Spezies zu liefern. Insofern stellt die zeitaufgelöste SERR-Spektroskopie einen hervorragenden Ansatz zur Analyse der Dynamik und Mechanismen komplexer Grenzschichtprozesse immobilisierter Enzyme dar und verspricht eine wichtige analytische Methode für die Untersuchung molekularer Strukturen und die Funktionsüberprüfung nanostrukturierter Systeme in der Biotechnologie zu werden.

Eingegangen am 29. Juni  
veränderter Fassung am 7. November 2000 [Z15360]

- [1] a) K. L. Prime, G. M. Whitesides, *Science* **1991**, 252, 1164; b) I. Willner, E. Katz, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1230; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 38, 1180.
- [2] T. Wink, S. J. van Zuilen, A. Bult, W. P. van Bennekom, *Analyst* **1997**, 122, 43.
- [3] I. Willner, E. Katz, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 3443; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 3723.
- [4] I. Willner, E. Katz, *New J. Chem.* **1999**, 23, 481.
- [5] a) S. Lecomte, H. Wackerbarth, T. Soulimane, G. Buse, P. Hildebrandt, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7381; b) H. Wackerbarth, U. Klar, W. Günther, P. Hildebrandt, *Appl. Spectrosc.* **1999**, 53, 283; c) S. Lecomte, P. Hildebrandt, T. Soulimane, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 10053.
- [6] a) S. Song, R. A. Clark, E. F. Bowden, M. J. Tarlov, *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 6564; b) T. M. Nahir, E. F. Bowden, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, 410, 9; c) R. A. Clark, E. F. Bowden, *Langmuir* **1997**, 13, 559; d) A. El Kasmi, J. M. Wallace, E. F. Bowden, S. M. Binet, R. J. Linderman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 225.
- [7] a) S. Terrettaz, J. Cheng, C. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7857; b) J. Cheng, S. Terrettaz, J. I. Blankman, C. J. Miller, B. Dangi, R. D. Guiles, *Isr. J. Chem.* **1997**, 37, 259.
- [8] a) Z. Q. Feng, S. Imabayashi, T. Kakiuchi, K. Niki, *J. Electroanal. Chem.* **1995**, 394, 149; b) A. Avila, B. W. Gregory, K. Niki, T. M. Cotton, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 2759.
- [9] A. Ulman, *An Introduction to Ultrathin Organic Films*, Academic Press, Boston, **1991**, S. 279, zit. Lit.
- [10] In dieser Arbeit wurde der früher beschriebene Aufbau<sup>[5b]</sup> dahingehend modifiziert, dass die Potentialsprünge elektronisch mit den Messintervallen synchronisiert wurden, die ihrerseits über eine Poekels-Zelle zur Intensitätsmodulation des angeregenden Laserstrahls kontrolliert wurden.
- [11] Y. Maeda, H. Yamamoto, H. Kitano, *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 4837.
- [12] D. Hobara, K. Niki, T. M. Cotton, *Biospectroscopy* **1998**, 4, 161.
- [13] P. Hildebrandt in *Cytochrome c: A Multidisciplinary Approach* (Hrsg.: R. A. Scott, A. G. Mauk), University Science Books, Sausalito, CA, **1995**.
- [14] Alle angegebenen Potentiale beziehen sich auf die gesättigte Kalomelektrode.
- [15] P. Hildebrandt, M. Stockburger, *Biochemistry* **1989**, 28, 6710.
- [16] R. Margalit, A. Schejter, *Eur. J. Biochem.* **1973**, 32, 492.
- [17] C. P. Smith, H. S. White, *Anal. Chem.* **1992**, 64, 2398.
- [18] Der lineare Bereich der Auftragung bis  $\delta < 7$  ms bleibt selbst bei Potentialsprüngen bis zu einer Größe von 0.35 V unverändert. Daher kann eine Überlagerung der ET-Kinetik mit der Relaxation der Doppelschicht ausgeschlossen werden.
- [19] G. W. Bushnell, G. V. Louie, G. D. Brayer, *J. Mol. Biol.* **1990**, 214, 585.
- [20] Eine merkliche Änderung des Abstandes zwischen Häm und der Elektrode würde die Adsorption über die „Rückseite“ des Proteins erfordern, was angesichts der stark asymmetrischen Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche sehr unwahrscheinlich ist.<sup>[19]</sup>
- [21] Auch für das an einer SAM-beschichteten Au-Elektrode adsorbierte Cyt-c wurde eine Kopplung des ET mit einem Reorientierungsprozess vorgeschlagen, der nach den Autoren jedoch deutlich schneller ablaufen sollte als der in dieser Arbeit gefundene Nicht-Faraday-Prozess.<sup>[8b]</sup>
- [22] Die entscheidende Bedeutung der Proteinorientierung kann auch der Grund für den relativ langsamen ET des aus Hefe isolierten Iso-1-Cytochrom c sein.<sup>[6d]</sup> Die wenn auch nur geringfügig andere Aminosäurezusammensetzung in der Bindungsdomäne (A. G. Mauk, *Struct. Bonding (Berlin)* **1991**, 75, 131) könnte zu einer Orientierung führen, die weniger günstig für den ET ist als im Falle des Cyt-c aus Pferdeherzen.
- [23] a) M. J. Honeychurch, *Langmuir* **1998**, 14, 6291; b) G. G. Láng, G. Horányi, *ACH Models Chem.* **1999**, 136, 669.