

Dünnere, kleiner, schneller – wie die IR-Spektroskopie zur Aufklärung des Funktionsmechanismus biologischer und biomimetischer Systeme beiträgt

Kenichi Ataka, Tilman Kottke und Joachim Heberle*

Einzelmoleküluntersuchungen · IR-Spektroskopie ·
Monoschichten · Reaktionsmechanismen ·
Zeitaufgelöste Spektroskopie

Neuere schwingungsspektroskopische Techniken sind sehr vielversprechende Methoden zur Untersuchung biologischer Materialien, da sie eine sehr hohe räumliche und zeitliche Auflösung bei gleichzeitiger minimaler Einflussnahme auf das zu untersuchende System ermöglichen. In diesem Kurzaufsatz werden diese Techniken und ihre potenzielle Bedeutung für biologische und biomimetische Systeme diskutiert. Vorgestellt werden z. B. die Verfolgung von Konformationsänderungen in Peptiden mit fs-Auflösung und nm-Empfindlichkeit mit 2D-IR-Spektroskopie sowie die Untersuchung des Effekts eines angelegten Membranpotentials auf einzelne Protonentransferschritte innerhalb integraler Membranproteine mit oberflächenverstärkter Infrarot-Differenz-Absorptionsspektroskopie. Schwingungsspektren einer molekularen Monoschicht können mithilfe der Summenfrequenz-Erzeugung registriert werden, während die Rasternahfeld-IR-Mikroskopie die Aufnahme chemischer Abbilder einer Oberfläche mit einer lateralen Auflösung < 50 nm ermöglicht.

1. Einleitung

Chemie ist die Wissenschaft der Zusammensetzung, Struktur und Eigenschaften von Materie sowie deren vielfältigen Reaktionen. Vom physikalischen Standpunkt aus betrachtet beruht Chemie auf Elektronenaffinitäten. Daher ist das Wissen um elektronische Strukturen und deren Dynamik eine Voraussetzung für ein grundlegendes Verständnis

der Reaktivität. Moderne Elektronenmikroskope ermöglichen bereits die Abbildung von Elektronendichten – Chemiker sprechen von den Orbitalen.^[1] Die Bewegung von Elektronen kann heutzutage in Echtzeit durch Attosekunden-Spektroskopie (entsprechend einem Zeitbereich von 10^{-18} s) verfolgt werden.^[2] Vor kurzem konnte mithilfe zeitaufgelöster Elek-

tronen^[3] und Röntgenbeugung^[4,5] solch eine Auflösung sogar in allen vier Dimensionen erreicht werden. Die Möglichkeiten dieser Methoden sind enorm, jedoch wird ihre Anwendbarkeit auf biologisches Material durch die für die Struktur und dynamische Integrität notwendige Gegenwart von Wasser eingeschränkt. Zudem werden die biologischen Proben durch die unvermeidlich hohe Strahlungsintensität leicht zerstört.

Die Schwingungsspektroskopie ist eine der wichtigsten biophysikalischen Analysemethoden für biologische Materialien, da sie eine hohe zeitliche Auflösung bei enormer Strukturempfindlichkeit bietet. Zudem beeinflusst die Infrarot-Spektroskopie dank der geringen Photonenenergie das zu untersuchende System praktisch nicht (minimal-invasiv). Die Untersuchung lebender Organismen auf atomarer Ebene befindet sich zwar noch im Anfangsstadium, allerdings wird die Schwingungsspektroskopie bereits erfolgreich auf Modellsysteme angewendet. Typischerweise verkörpern solche Modelle Teile des Organismus unter möglichst naturnahen,

[*] Dr. K. Ataka, Prof. Dr. J. Heberle
Fachbereich Physik – Experimentelle Molekulare Biophysik
Freie Universität Berlin
Arnimallee 14, 14195 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-838-56510
E-Mail: joachim.heberle@fu-berlin.de
Homepage: <http://www.physik.fu-berlin.de/einrichtungen/ag/ag-heberle/index.html>

Dr. T. Kottke
Fakultät für Chemie – Biophysikalische Chemie
Universität Bielefeld
Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)

physiologischen Bedingungen (Biomimetik). Dieser Kurzaufsatz erläutert aktuelle technische Fortschritte bei der schwingungsspektroskopischen Charakterisierung von Proteinen, unterteilt in Techniken, die die Untersuchung von a) dünnen Probenschichten bis hinunter auf die Ebene einzelner Monoschichten und b) kleinen Bereichen unterhalb der Beugungsgrenze ermöglichen und c) die ausreichend schnell sind, um Elementarreaktionen zu erfassen (Abbildung 1). Eine Diskussion der THz-Spektroskopie, bei deren Anwendung auf Biomoleküle bereits beeindruckende Fortschritte zu verzeichnen sind,^[6,7] übersteigt den Umfang dieses Kurzaufsatzes.

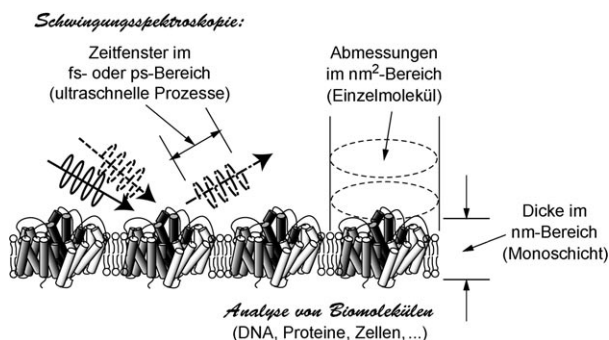


Abbildung 1. Größen- und Zeitskalen biologischer Proben, die mit den hier vorgestellten Methoden untersucht werden können.

2. Dünner

Die Anwendung der Infrarot-Spektroskopie auf Monoschichten hat eine lange Geschichte, die bis in die 1960er Jahre zurückreicht, als die Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) entwickelt wurde.^[8] Erste Versuche erfolgten an Festkörpern unter Ultrahochvakuum,^[9] wurden jedoch bald auf Fest-flüssig-Grenzflächen (mit Metallen)^[10–12] oder Luft-flüssig-Grenzflächen^[13] erweitert. Um die Eigenschaften der Luft-flüssig-Grenzflächen bezüglich biomimetischer Membranen zu untersuchen, wurden IRRAS-Experimente an einzelnen Lipidmonoschichten durchgeführt, die mithilfe der Langmuir-Blodgett-Technik (LB-Technik) hergestellt worden waren. Schließlich wurde dieser Ansatz auch

auf die Analyse der Sekundärstruktur von Peptiden oder Proteinen erweitert, die in eine Lipiddoppelschicht eingebettet waren. Thakur und Leblanc gelangen auf diese Weise die Bestimmung der Orientierung von Lysozym in Langmuir-Schichten und der Nachweis von Änderungen der Proteinsekundärstruktur in Abhängigkeit von der Oberflächenspannung.^[14] Kouzyzha et al. wendeten dieselbe Methode auf das Alanin-reiche Polypeptid $K_3A_{18}K_3$ an.^[15]

Trotz der bereits erheblich verbesserten IRRAS-Empfindlichkeit bleibt die Funktionsanalyse von Proteinen mithilfe der IR-Spektroskopie äußerst anspruchsvoll, besonders bei der Untersuchung von Proteinmonoschichten. Funktionsstudien an Enzymen stehen vor der beschwerlichen Aufgabe, geringste Strukturänderungen vor dem Hintergrund der enorm großen Zahl an Normalmoden des Proteins zu detektieren. Die entsprechenden Absorptionsänderungen der IR-Banden liegen dabei in der Größenordnung von 10^{-6} . Leider ist die IRRAS-Empfindlichkeit normalerweise nicht ausreichend für die Erfassung solcher kleiner Differenzsignale. In solchen Fällen ist die oberflächenverstärkte IR-Absorption mithilfe der SEIRAS-Technik zu bevorzugen.

2.1. Oberflächenverstärkte IR-Absorptionsspektroskopie (SEIRAS) an Monoschichten

Die IR-Absorption eines Moleküls kann verstärkt werden, wenn es auf einer nanoskalig rauen Metalloberfläche gebunden ist.^[16] Diese Verstärkung ist darauf zurückzuführen, dass eine dielektrische Änderung des Metallfilms bei jener Frequenz auftritt, bei der die adsorbierten Moleküle schwingen. Metallfilme zeigen wegen des Auftretens der Oberflächenplasmonenpolaritonen (surface plasmon polaritons, SPPs) eine sehr breite Absorption vom nahen bis zum mittleren IR-Bereich. Der schwingende Dipol der adsorbierten Moleküle moduliert diese Absorption in einem schmalen Spektralbereich mit einer Stärke des 10- bis 100-Fachen der ursprünglichen Molekülschwingung. Infolgedessen wird die Schwingung der adsorbierten Moleküle verstärkt, wobei die reale Verstärkung durch die Wechselwirkung mit der Metallabsorption hervorgerufen wird. Dieses Phänomen wird oberflächenverstärkte IR-Absorption (surface-enhanced infrared absorption, SEIRA; Abbildung 2a) genannt. Wie bei jedem optischen Nahfeldeffekt ist die Si-



Kenichi Ataka promovierte 1996 an der Tohoku University (Sendai, Japan). Während seines Postdoktorats (1996–2001) forschte er bei M. Osawa im Catalytic Research Centre an der Hokkaido University (Sapporo). Als Alexander von Humboldt-Stipendiat wechselte er 2001 in die Gruppe von J. Heberle, zunächst am FZ Jülich, dann an der Universität Bielefeld. Unterstützt von der „Japan Science and Technology Agency“ arbeitet er nun als PREST-Stipendiat an der FU Berlin. Er befasst sich mit der Entwicklung und Anwendung analytischer Oberflächentechniken zur Funktionsuntersuchung von Proteinen und anderen Biomolekülen.



Tilman Kottke studierte Chemie an der Philipps-Universität Marburg, mit einem Aufenthalt am Imperial College London. Seine Doktorarbeit führte er in physikalischer Chemie an der Universität Regensburg (2003) bei B. Dick durch. Als Helmholtz-Nachwuchsgruppenleiter ging er an das Forschungszentrum Jülich und später an die Universität Bielefeld in die Gruppe von J. Heberle. Derzeit ist er Habilitand in Bielefeld. Sein Hauptinteresse gilt der elektronischen und Schwingungsspektroskopie an biologischen Blaulichtrezeptoren.

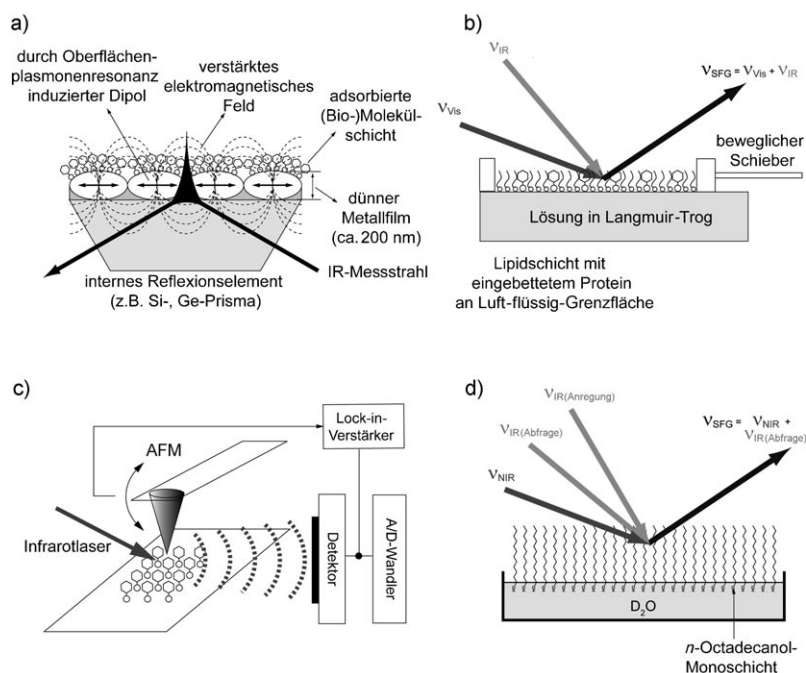


Abbildung 2. Experimentelle Aufbauten für a) SEIRAS, b) SFG-Spektroskopie, c) SNIM und d) SFG-2D-IR-Spektroskopie.

gnalverstärkung bei der SEIRA-Spektroskopie auf die unmittelbare Umgebung der Oberfläche begrenzt und klingt innerhalb der ersten 10 nm ab. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, die Schwingungsbeiträge der oberflächen gebundenen Moleküle von denen der in Lösung befindlichen zu unterscheiden. Obwohl der SEIRA-Effekt auch in Transmission genutzt werden kann, hat sich die so genannte abgeschwächte Totalreflexion (ATR) in praktischer Hinsicht als sehr vorteilhaft erwiesen. Dazu wird ein 10–100 nm dünner Film auf der Reflexionsoberfläche eines ATR-Prismas abgeschieden, was in interner Reflexion den direkten Zugang zur Probe und damit eine einfache Manipulation der Bedingungen erleichtert. So sind unter anderem die Bestimmung der Proteinadsorption auf dem Metallfilm, ein Austausch der umgebenden Lösung, die Belichtung der Probe sowie die Anlegung einer Potentialdifferenz über den Metallfilm möglich.^[17]

Da die Feldverstärkung auf die unmittelbare Umgebung der Oberfläche beschränkt ist, muss die biologische Probe an

der Metalloberfläche fixiert werden. Dabei muss jedoch unbedingt beachtet werden, dass Proteine sehr empfindlich auf Änderungen in der Umgebung reagieren und durch die direkte Adsorption an eine Metalloberfläche möglicherweise denaturieren. Selbst ohne eine vollständige Denaturierung ist die Proteinfunktion gefährdet, wenn bestimmte Anforderungen wie Orientierung, Bindungsart oder der Abstand von der Oberfläche nicht korrekt erfüllt sind. Zur Steuerung der Adsorptionsbedingungen wird die Festkörperoberfläche chemisch modifiziert. Dies hat den zusätzlichen Vorteil, dass die mögliche Beeinträchtigung der Funktionalität der Biomoleküle durch das Metall durch die Unterschichtung mit organischen Molekülen abgemildert wird. Hierbei wird häufig auf selbstorganisierte Monoschichten (self-assembled monolayers, SAMs) zurückgegriffen. Hierfür wird die starke Neigung endständiger Thiolgruppen zur Bildung quasi-kovalenter Bindungen mit metallischen Oberflächen genutzt.^[18]

SEIRAS wurde schon häufig zur Untersuchung elektrochemischer Grenzflächen eingesetzt, indem der feldverstärkende Metallfilm auch als Elektrode genutzt wurde.^[19,20] Dabei können die Strukturänderungen im adsorbierten Protein nach direktem Elektronentransfer von der Elektrode in situ beobachtet werden. Dieser Ansatz wurde bei Funktionsstudien redoxgetriebener Proteine genutzt, um zum ersten Mal die Strukturänderungen einer Monoschicht aus Cytochrom *c* (Cyt *c*) nachzuweisen.^[21,22] Cyt *c* wurde dabei über chemische Modifikation der Goldoberfläche orientiert gebunden, wodurch ein gerichteter Elektronentransfer durch das extern angelegte Elektrodenpotential induziert werden konnte. Die Aufnahme der Spektren erfolgte simultan zur Cyclovoltammetrie, wodurch eine direkte Korrelation der Strukturänderungen im Protein (als Ergebnis der IR-Spektroskopie) mit dem Elektronentransfer (über die Elektrochemie) möglich wurde. Diese Experimente zeigen, dass mit



Joachim Heberle studierte Chemie in Stuttgart und Würzburg. Nach seiner Diplomarbeit in physikalischer Chemie in Würzburg (1988) wechselte er an die FU Berlin. Nach der Promotion in Biophysik (1991) ging er als Postdoktorand an das Hahn-Meitner-Institut in Berlin (Institut für Neutronenstreuung). Ab 1993 baute er eine unabhängige Arbeitsgruppe für biomolekulare Spektroskopie am FZ Jülich auf (Institut für Strukturbiologie, IBI-2). Nach seiner Habilitation an der Universität Düsseldorf (1998) nahm er 2005 den Ruf an die Universität Bielefeld auf den Lehrstuhl für Biophysikalische Chemie an. Seit 2009 ist er Professor für experimentelle molekulare Biophysik an der FU Berlin.

SEIDAS (Surface-Enhanced IR Difference Spectroscopy) auch kleinste Strukturänderungen, die während der Redoxreaktion von Cyt *c* auftreten, analytisch zugänglich sind. Im nächsten Schritt konnte die Kinetik der Redoxreaktion im Mikro- bis Millisekundenbereich durch zeitaufgelöste SEIRAS in Kombination mit einer Potentialsprungmethode ermittelt werden.^[23]

Eine ähnliche Strategie wurde in Funktionsstudien von Hydrogenasen angewendet.^[24] Wisitruangsakul et al.^[25] nahmen hierfür SEIRA-Spektren einer [NiFe]-Hydrogenase auf, die Protonen zu molekularem Wasserstoff reduziert. Mit SEIRAS wurde die Molekülstruktur der CO- und CN-Liganden des zweikernigen Ni₂Fe-Zentrums der Hydrogenase während der enzymatischen Wasserstoffproduktion unter Spannungskontrolle aufgelöst. Krassen et al.^[26] nutzten eine Hydrogenase, um zusammen mit Photosystem I aus Cyanobakterien einen Hybridkomplex herzustellen, der in der Lage ist, photobiologisch Wasserstoff zu entwickeln. Der Hybridkomplex wurde entlang einer Elektrodenoberfläche schrittweise aufgebaut und durch SEIRAS *in situ* kontrolliert.

Aufgrund ihrer Monoschichtempfindlichkeit ist SEIDAS eine ausgezeichnete Methode für die Untersuchung der Funktion von Membranproteinen^[27] – schließlich sind diese als Monoschicht in Zellmembranen eingelagert. Über die Steuerung der Proteinorientierung durch eine chemisch modifizierte Oberfläche^[28,29] kann ein biomimetisches Modell einer Zellmembran auf einer Metallelektrode aufgebaut werden, über die ein elektrisches Feld angelegt werden kann. Solch ein Membranpotential spielt eine zentrale Rolle für die Funktion eines jeden Membranproteins. Allerdings gibt es bisher keine biophysikalische Methode, die die sehr geringen mit der Funktion einhergehenden Strukturänderungen in einer Proteinmonoschicht nachweisen kann. Jiang et al.^[30] wendeten SEIDAS auf die Lichtreaktion des sensorischen Rhodopsins II an, eines von zwei Lichtsensoren, die die phototaktische Reaktion von Archaeobakterien steuern. In diesen Experimenten wurde die Elektrodenspannung variiert, was einer Änderung des Membranpotentials entspricht. Das angelegte elektrische Feld hat eine spezifische Wirkung auf einen einzelnen Protonentransferschritt, nicht aber auf die Strukturänderungen des Proteins. Somit konnte nun nicht nur der Einfluss des Membranpotentials auf dieses Membranprotein auf molekularer Ebene aufgeklärt werden – die Methode ebnet auch neue Wege zur mechanistischen Charakterisierung spannungsgesteuerter Ionenkanäle. Wegen deren Bedeutung in der Neurologie gilt dieser Anwendung größtes biomedizinisches Interesse.

Die SEIRA-Spektroskopie ist in ihrer Anwendung nicht nur auf isolierte Proteine begrenzt, sondern wurde bereits an ganzen Zellen durchgeführt. Busalmen et al.^[31,32] verfolgten das Absorptionsverhalten und die Redoxreaktion des Bakteriums *Geobacter sulfurreducens* an einer Goldelektrodenoberfläche mit SEIRAS. Diese Eisen(III) reduzierenden Bakterien unterstützen ihr eigenes Wachstum, indem sie Elektronen an die Metalloberfläche abgeben, um organische Verbindungen oxidieren zu können. In der Außenmembran gibt es viele Cytochrome vom *c*-Typ, die im Kontakt mit einer Elektrode den direkten Elektronentransfer ermöglichen. Bei einem Potential von 0.17 V (gegen Ag/AgCl) treten große

Signaländerungen in den SEIRA-Spektren auf, deren spektrale Signatur ähnlich denen des isolierten Cyt *c* sind.

2.2. Summenfrequenz-Erzeugung (SFG)

Bei der Untersuchung von Proteinmonoschichten hat sich die Summenfrequenz-Erzeugung (Sum Frequency Generation, SFG) als äußerst leistungsstarke schwingungsspektroskopische Methode erwiesen (Abbildung 2b). Hinter der SFG verbirgt sich ein nichtlinearer optischer Prozess zweiter Ordnung, bei dem zwei Lichtstrahlen einen Dritten erzeugen, dessen Frequenz der Summe der optischen Frequenzen der beiden erzeugenden Strahlen entspricht.^[13] In der SFG-Spektroskopie werden zwei gepulste Laser verwendet, von denen typischerweise einer auf eine feste Frequenz im sichtbaren Bereich eingestellt wird, während der andere durchstimmbare im Infrarotbereich ist. Beide Strahlen treffen räumlich und zeitlich aufeinander abgestimmt an einer Grenzfläche aufeinander. Dort wird Licht mit der Energie der Summenfrequenz reflektiert und anschließend gesammelt. Da als Voraussetzung für die Erzeugung der Summenfrequenz die Probe über keine Inversionssymmetrie verfügen darf, ist die SFG-Spektroskopie intrinsisch eine oberflächen-spezifische Methode. Inversionssymmetrische Medien wie Lösungen verhindern die SFG, doch an Oberflächen wird eine Inversionssymmetrie zwangsläufig gebrochen, sodass das SFG-Signal ausschließlich von der Monoschicht an Molekülen an der Oberfläche ausgeht, ohne weiteren Einfluss des umgebenden Materials.

Die Theorie der SFG-Spektroskopie ist seit den 1960er Jahren bekannt, wurde jedoch wenig beachtet.^[33,34] Erst in den 1980er Jahren wurde sie als analytisches Hilfsmittel für die Oberflächencharakterisierung, mit dem sich Proben mit einer Stärke von weniger als einer Monoschicht empfindlich nachweisen lassen, wiederentdeckt.^[35,36] Zur Erzeugung des SFG-Signals sind intensive Laserpulse erforderlich (z. B. $E = 5\text{--}15\text{ }\mu\text{J}$ pro Puls, $\Delta t = 3\text{ ps}$). Zu Beginn der SFG-Entwicklung war das Fehlen geeigneter durchstimmbarer Laserquellen mit ausreichend hoher Intensität im mittleren und fernen Infrarot ein großes Problem, sodass die Anwendung auf den nahen IR-Bereich von $3\text{--}5\text{ }\mu\text{m}$ ($> 2000\text{ cm}^{-1}$) beschränkt blieb. Aus diesem Grund konzentrierten sich SFG-Experimente an Peptiden und Proteinen anfänglich nur auf die C-H- oder die O-H-Streckschwingungen,^[37] die ausschließlich Informationen über hydrophobe Seitenketten lieferten. Einzige Ausnahme bildete die Nutzung der hochintensiven und durchstimmbaren Emission eines Freie-Elektronen-Lasers für den mittleren IR-Bereich.^[38] Erst in den vergangenen fünf Jahren gelangen dank der Entwicklung von leistungsstarken und kompakten IR-Lasern SFG-Experimente im Amid-I-Bereich (ca. 1650 cm^{-1}).^[39]

Der entscheidende Vorteil der SFG-Spektroskopie liegt in ihrer Einsetzbarkeit entlang nahezu jeder Grenzfläche (fest-flüssig, Luft-flüssig oder flüssig-flüssig wie bei Öl-Wasser-Grenzflächen).^[40] Mit diesem Vorteil übertrumpft sie andere oberflächenempfindliche Schwingungsmethoden wie SERS oder SEIRAS, die auf Grenzflächen zu Metallen angewiesen sind. Die Oberflächenempfindlichkeit von SFG-

Spektroskopie wurde kürzlich durch die Entwicklung der breitbandigen SFG-Spektroskopie mit Überlagerungsdetektion verbessert,^[47] die den Nachweis von Bruchteilen einer Monoschicht ermöglicht. Die Anwendung der SFG-Spektroskopie auf biologische Proben konzentrierte sich anfangs auf die Strukturuntersuchung von Lipidschichten an der Luft-Wasser-Grenzfläche,^[41] wurde jedoch schnell auf Sekundärstrukturanalysen an Membranproteinen, die in Lipidschichten eingebettet waren, erweitert. Chen und Mitarbeiter haben die SFG-Spektroskopie intensiv als In-situ-Analysenmethode zur Untersuchung der Struktur kleiner Proteine (z.B. Fibrinogen,^[42,43] Melittin^[44] und das foot-Protein aus *Mytilus edulis*^[45]) oder Membranproteinfragmente (G-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheit ($G_{\beta\gamma}$)^[46]) in Lipiddoppelschichten verwendet. So wurde beispielsweise die Amid-I-Bande analysiert, um die Adsorption und Orientierung der $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit innerhalb einer POPC(1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin)-Lipiddoppelschicht zu ermitteln.^[47] In der Amid-I-Bande sind die Sekundärstrukturelemente einer komplexen Proteinstruktur enthalten, allerdings erschwert die spektrale Überlappung der einzelnen Elemente eine detaillierte Sekundärstrukturanalyse, die auf der Anpassung der Einhüllenden basiert. Durch die Einbeziehung der Polarisierung und ihrer Variation in Anregungs- und Messstrahl ergeben sich weitere Strukturparameter für die Bandenanalyse. Diese Erweiterung der SFG wird als SSP oder PPP (entsprechend der senkrechten (S) oder parallelen (P) Vis- bzw. der IR-SFG-Polarisation) bezeichnet. Aufbauend auf solchen polarisationsabhängigen Daten konnte festgestellt werden, dass die $G_{\beta\gamma}$ -Orientierung um -35° gegenüber der Oberflächennormalen der Lipidschicht gekippt ist.

Die SFG-Spektroskopie ist eine sehr vielseitige Methode zur Untersuchung molekularer Prozesse an praktisch jeder beliebigen Grenzfläche, setzt jedoch hochmoderne Lasertechnik voraus. Dagegen liegt die Stärke der SEIRA-Spektroskopie in der einfacheren Durchführung sowie der Möglichkeit zur Untersuchung von Konformationsänderungen und Protonentransferschritten in Proteinen, während diese katalytisch aktiv sind.

3. Kleiner

3.1. Rasternahfeld-IR-Mikroskopie (SNIM)

Obwohl mit der Schwingungsspektroskopie die Molekülstruktur auf der Ebene von Monoschichten (entsprechend weniger nm) aufgelöst werden kann, ist die laterale Auflösung beugungsbegrenzt (ca. $5\ \mu\text{m}$ im mittleren IR-Bereich). Die Einführung von Nahfeldsonden hebt diese Einschränkung auf. Das optische Rasternahfeldmikroskop (scanning near-field optical microscope, SNOM) löst Details unterhalb der eingesetzten Wellenlänge auf, da es eine Nahfeldsonde anstatt einer Strahlfokussierung verwendet.^[48] SNOM erfordert eine winzige Apertur mit einem Durchmesser deutlich unterhalb der Wellenlänge. Das durch diese Apertur austretende Licht bleibt innerhalb einer kurzen Distanz hinter der Apertur eingegrenzt. Innerhalb dieses Bereichs muss daher die Probe für eine Nahfeldaufnahme positioniert sein. Wegen

der geringen Durchlässigkeit metallischer Aperturen bei $\lambda/10$ (ca. $50\ \text{nm}$) begrenzen diese weiterhin die derzeit erreichbare Auflösung einer SNOM-Aufnahme. Überträgt man dieses Prinzip auf den mittleren IR-Bereich, führt das zu einer Begrenzung der technischen Auflösung auf $1\ \mu\text{m}$, die für die abbildende Mikroskopie von subzellulären Strukturen oder in der Nanoelektronik vollkommen unzureichend ist. In der so genannten „scattering type“-Rasternahfeldmikroskopie (s-SNIM)^[49] wird die räumliche Auflösung durch eine aperturlose Spitze erreicht. Solch eine spitze Metallnadel wird üblicherweise in der Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM) verwendet (Abbildung 2c). In der s-SNIM entspricht die Funktion dieser Nadel der einer optischen Antenne, die ein verstärktes elektrisches Feld im Bereich der äußersten Spitze hervorruft. Der Durchmesser des verstärkten Feldes entspricht ungefähr dem Krümmungsradius der Spitze, der damit die Auflösung des Mikroskops definiert (gegenwärtig $10\text{--}20\ \text{nm}$ ^[48]). Die Wechselwirkung zwischen dem Feld an der Spitze und der Probe wird durch eine kleine senkrechte Oszillation der Spitze moduliert, was durch den Tapping-AFM-Modus des metallbeschichteten Federhebels erreicht werden kann. Das modulierte Nahfeldsignal wird demoduliert und durch einen Lock-in-Verstärker zur Unterdrückung der Hintergrundstreuung verstärkt. Folglich setzt sich ein s-SNIM-Experiment aus einem Standard-AFM in Kombination mit einer IR-Streu-Messapparatur zusammen.

Die erste s-SNIM-Aufnahme wurde von Keilmann und Knoll veröffentlicht.^[49,50] Dabei wurde das chemische Abbild einer gemischten Schicht aus Polymethylmethacrylat und Polystyrol mit einer Auflösung von $100\ \text{nm}$ erstellt, was etwa einem Hundertstel der eingesetzten Wellenlänge entspricht ($\lambda = 9\text{--}11\ \mu\text{m}$ eines CO-Lasers). An der Grenze zwischen den beiden Polymeren konnten Kontrastveränderungen beobachtet werden, die auf unterschiedliche IR-Absorption zurückzuführen sind. Es wurde eine deutliche Kontrastverstärkung beobachtet, was die Beteiligung des SEIRA-Effekts im Nahfeldbereich der Spitze vermuten lässt.

Kopf et al. veröffentlichten kürzlich s-SNIM-Experimente an einem SAM-Film von 1-Octadecanthiolat und biotinyliertem Alkylthiolat (BAT) auf einer Goldschicht.^[51] Dabei waren die Muster der beiden unterschiedlichen SAMs mit einer lateralen Auflösung von ca. $90 \times 90\ \text{nm}^2$ zu erkennen, was einer Nachweisgrenze von $27\ \text{Attogramm}$ ($10^{-18}\ \text{g}$) oder etwa $30000\ \text{BAT-Molekülen}$ gleichkommt. s-SNIM wurde zwar bislang nicht auf Monoschichten oder Oberflächen biologischer Moleküle angewendet, verspricht aber eine gute Möglichkeit zu werden, um Schwingungsspektroskopie an Einzelmolekülen ohne invasive Markierung des Materials durchzuführen.

SNIM kann mit der spitzenverstärkten Raman-Spektroskopie (Tip-Enhanced Raman Spectroscopy, TERS) verglichen werden, die ebenfalls das Prinzip der Streulichtdetektion nutzt.^[52,53] Wegen des Einsatzes sichtbarer Laserstrahlung ist TERS gegenüber SNIM deutlich im Vorteil, da keine durchstimmbaren Laser im mittleren IR-Bereich eingesetzt werden müssen. Allerdings kann das starke elektromagnetische Feld an der TERS-Spitze zu Schäden in den empfindlichen (biologischen) Proben führen.

4. Schneller

4.1. Zeitaufgelöste IR-Spektroskopie von Mikro- bis Femtosekunden

Viele wichtige Zwischenschritte im Funktionsablauf von Proteinen finden in einem Zeitfenster von Mikro- bis Millisekunden statt. In diesem Bereich kann konventionelle dispersive Spektroskopie zwar eingesetzt werden, ist jedoch meist durch die geringe Strahlungsemission der verfügbaren Breitband-IR-Quellen eingeschränkt. Stattdessen können durchstimmbare Laserquellen wie Bleisalzlaserdioden eingesetzt werden.^[54] Dieser Ansatz könnte sich durch die Entwicklung neuartiger Quantenkaskadenlaser für den mittleren IR-Bereich weiter durchsetzen, die sich durch hohe Leistungen bei leichter Bedienbarkeit auszeichnen. Eine deutliche Verbesserung der spektralen Auflösung und des Signal/Rausch-Verhältnisses wurde durch die Anwendung des Step-Scan-Verfahrens der Fourier-Transformations-Spektroskopie erzielt, mit ihrem Vorteil der breitbandigen (Multiplex-)Detektion.^[55] Diese Technik ist als Erweiterung moderner FT-IR-Spektrometern erhältlich, muss jedoch vom Anwender modifiziert werden, um komplexe biologische Systeme mit ihren kleinen Differenzsignalen zu analysieren.^[56] Die Step-scan-Spektroskopie wurde und wird noch immer als wichtige Methode bei der Aufklärung von Reaktionsprozessen in Proteinen, die meisten davon lichtgesteuert, eingesetzt. Aktuelle Beispiele reichen von der archaebakteriellen Protonenpumpe Bacteriorhodopsin^[57] über Blaulichtrezeptoren^[58,59] bis hin zum Lichtsammelkomplex des Photosyntheseapparates^[60] und seines Photosystems I.^[61,62] Das Prinzip kann sogar auf einzelne, nur einige Mikrometer große Proteinkristalle angewendet werden.^[63]

Zeitaufgelöste Spektroskopie an Proteinen mit einer Auflösung von Femtosekunden im mittleren IR-Bereich ist noch immer eine schwierige Aufgabe. Die Anregungs-Abfrage-Methode (Pump-Probe-Methode) wird seit Jahren im sichtbaren Spektralbereich eingesetzt, doch sind die breiten elektronischen Banden weniger aussagekräftig für chemische Reaktionsabläufe als die Schwingungsbanden mit ihrem hohen Informationsgehalt. Ursprünglich wurden Messungen bei einzelnen Wellenlängen durchgeführt, bei denen das Anregungslicht eines kontinuierlichen IR-Lasers für die Detektion in den sichtbaren Spektralbereich konvertiert wurde.^[64] Erst die Entwicklung von IR-Array-Detektoren ermöglichte die Anwendung der Anregungs-Abfrage-Technik mit gepulsten Lasern. Dabei wird ein spektral breiter Puls durch ein Beugungsgitter aufgespalten und die vollständige spektrale Information nach einer Verzögerungszeit aufgenommen.^[65] Die Einführung eines stabilen Titan-Saphir-Festkörper-Lasers für Anregungs- und Abfragepulse führte zu einer deutlichen Verbesserung der spektroskopischen Anwendungen. Differenzsignale im Infrarotbereich sind wegen der geringen Extinktionskoeffizienten der IR-Absorptionsbanden mehr als zwei Größenordnungen kleiner als im sichtbaren Bereich. Deshalb und wegen der starken IR-Absorption von Wasser im mittleren IR-Bereich müssen Proteinproben stark konzentriert vorliegen. Trotz dieser Schwierigkeiten konnte der Reaktionsverlauf aus dem angeregten Zustand einer Fülle

verschiedener Proteine mithilfe ultraschneller, dispersiver IR-Spektroskopie in einem breiten Spektralbereich verfolgt werden. Besonderes Interesse galt dabei Isomerisierungen in Photorezeptoren. So ist die 200-fs-Umschaltung des Retinals im visuellen Rhodopsin eine der schnellsten Reaktionen in der Natur.^[66] Mithilfe der IR-Spektroskopie konnte eine Zeitkonstante von 500 fs für die Isomerisierung des Retinals im lichtgetriebenen Bacteriorhodopsin ermittelt werden.^[67] Aktuelle Beispiele sind die bistabile Umschaltung von linearem Tetrapyrrol in Phytochromen, bei denen das lichtinduzierte Ein-^[68] und Ausschalten^[69] erstmals mit ultraschneller IR-Spektroskopie verfolgt werden konnten. Eine weitere Stärke der IR-Spektroskopie ist die Detektion von Wasserstoffbrücken. So konnte z.B. die Bedeutung des Bruchs einer Wasserstoffbrücke für die Isomerisierung des Chromophors *p*-Cumarsäure im Photoactive-Yellow-Protein nachgewiesen werden.^[70] Außerdem wurde eine Umlagerung des Wasserstoffbrückennetzwerks um den Chromophor einer BLUF-Domäne (eines FAD-haltigen Blaulichtensors) herum als erster Schritt nach dem Elektronentransfer zum Flavin-Co-faktor postuliert.^[71]

4.2. Zweidimensionale IR-Spektroskopie

Das Problem der herkömmlichen (1D-)IR-Spektroskopie an komplexen Systemen wie Biomolekülen ist der Mangel an räumlicher Information. Für eine Interpretation der Signale im Rahmen eines Modells auf molekularer Ebene müssen daher Informationen aus NMR-Spektroskopie oder Röntgenstrukturanalyse herangezogen werden. Im Unterschied dazu liefert die zweidimensionale (2D-)IR-Spektroskopie räumliche Information durch direkte Analyse von Kreuzkorrelationen, die durch Schwingungskopplung entstehen, unter Einbeziehung von theoretischen Modellen. Sie ist damit komplementär zur NMR-Spektroskopie, bei der die Zeitauflösung im Bereich von Millisekunden liegt, und zur zeitaufgelösten Röntgenkristallographie. Es lassen sich mit der 2D-IR-Spektroskopie Wechselwirkungen zwischen entfernten funktionellen chemischen Gruppen untersuchen und nachweisen.

Mit 2D-IR-Spektroskopie ist in diesem Kontext die fs-gepulste Spektroskopie gemeint, im Unterschied zur konventionellen 2D-FT-IR-Spektroskopie, der so genannten Korrelationsspektroskopie. Ein 2D-IR-Experiment wird entweder in der Frequenz-^[72] oder in der Zeitdomäne^[73] durchgeführt. Der erste Fall unterscheidet sich nicht von der konventionellen Anregungs-Abfrage-Spektroskopie und kann durch Variation der Frequenz des schmalbandigen Anregungslasers und Aufnahme der transienten Spektren durch einen Breitbandpuls nach voreingestellten Verzögerungszeiten realisiert werden. Die Nutzung der Zeitdomäne nennt sich auch Echo-Spektroskopie und ist in ihrer Pulssequenz ähnlich der NMR-basierten Korrelations(COSY)- oder Kern-Overhauser-Effekt-Spektroskopie (NOESY).^[74] Dabei wird die Schwingungskohärenz zunächst aufgebaut, dann unterbrochen und schließlich der erzeugte freie Induktionszerfall (free induction decay, FID) zeitlich verfolgt. Der FID klingt deutlich schneller ab als bei der NMR-Spektroskopie, wo-

durch eine Zeitauflösung von einigen zehn Pikosekunden durch 2D-IR-Spektroskopie erreicht werden kann. Analog zur NMR-Spektroskopie ergeben sich die 2D-IR-Spektren durch Fourier-Transformation des FID-Signals.

In einem 2D-IR-Spektrum entstehen durch Vergleich einer Messung mit und ohne Pump-Puls zwei grundsätzliche Merkmale: Elemente auf der Diagrammdiagonale stammen von Schwingungsübergängen der angeregten Oszillatoren. Diese Signale reflektieren die Absorption des angeregten Zustands (positives Signal) und die stimulierte Emission (negatives Signal). Zusätzlich trägt die Grundzustandsabsorption des Messpulses nach Entvölkerung durch den Anregungspuls zum negativen Signal bei. Das Signalpaar wird durch die Anharmonizität in seiner Frequenz getrennt (Abbildung 3). Das zweite wichtige Merkmal ist das Auftreten von zusätzlichen Kreuzkorrelationen abseits der Diagonalen, die durch anharmonische Kopplung verschiedener Oszillatoren entstehen. Diese Kopplung gibt Aufschluss über Strukturdetails des Systems.

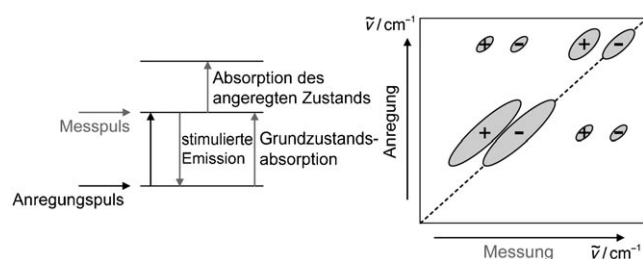


Abbildung 3. Schematisches 2D-IR-Spektrum mit den negativen Beiträgen aus der stimulierten Emission und der Grundzustandsabsorption sowie mit den positiven Signalen aus der Absorption des angeregten Zustands. Die zusätzlichen Signale außerhalb der Diagonalen ermöglichen die Bestimmung von Schwingungskopplungen zwischen den Oszillatoren, woraus die 3D-Strukturinformation gewonnen wird.

Einer der Schwerpunkte bisheriger 2D-IR-spektroskopischer Experimente an komplexen Molekülen war die Amid-I-Schwingung von Peptiden und Proteinen. Die C=O-Streckschwingung des Peptidrückgrats ist ein starker Oszillator, der mit umgebenden Schwingungen ähnlicher Frequenz koppelt. Diese Kopplung kann auch durch den Raum hindurch stattfinden, z.B. über dipolare Wechselwirkungen und über kovalente Bindungen (wie über das C α -Atom des Rückgrats) oder sogar über Wasserstoffbrücken. Daher wurde die Strukturinformation nicht direkt aus der Kopplung, sondern aus der Analyse der Winkelabhängigkeit und der Orientierung der Oszillatoren zueinander abgeleitet. Hierbei wird entweder ein theoretisches Modell angewendet, um die Spektren zu simulieren und die Information zu extrahieren, oder man nutzt die unterschiedliche Polarisationsabhängigkeit der Kreuzkorrelationen.^[75] Das Potenzial der 2D-IR-Spektroskopie und die Korrektheit der damit erstellten Modelle wurden anhand der bekannten Struktur eines cyclischen Pentapeptids überprüft.^[76] Im nächsten Schritt wurden die Kopplungsstärke und der Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten im Tri-Alanin mit seinen zwei Peptidcarbo-

nylen bestimmt.^[77] Unter Zuhilfenahme quantenmechanischer Rechnungen erhält man über die Kopplungsstärke den Diederwinkel des Rückgrats. Auf diese Weise können also dreidimensionale Parameter aus den infrarotspektroskopischen Experimenten abgeleitet werden. Um diesen Durchbruch in der Analyse der schwachen Kreuzkorrelationen zu ermöglichen, wurden die starken Diagonalsignale unterdrückt, indem ihre abweichende Polarisationsabhängigkeit genutzt wurde.^[77,78] Beim Übergang zu größeren Systemen verschwimmt diese Information zwar wegen der Vielzahl überlappender Banden und der vielfältigen Kopplungsmechanismen, dennoch ist bei Peptiden und Proteinen eine Unterscheidung von Sekundärstrukturelementen anhand der spezifischen Position, Aufspaltung, Amplitude und Linienform der Kreuzkorrelationen und der Signale auf der Spektrendiagonalen möglich. Dies konnte für antiparallele β -Faltblätter verschiedener Modellproteine^[79] und 3_{10} - α -Helices von Octapeptiden^[80,81] demonstriert werden. Die Analyse der Unterschiede in der Kopplung der Amid-I'- zur Amid-II'-Schwingung verbessert die Spezifität weiter.^[82] 2D-IR-Spektroskopie ermöglicht daher eine Optimierung der quantitativen Beschreibung der Exciton-ähnlichen Amidmoden durch theoretische Methoden. Diese Verbesserung wird einen großen Einfluss auf die Sekundärstrukturbestimmung von Proteinen im Allgemeinen haben.

Wie bereits erwähnt, erschwert die spektrale Überfüllung der 2D-IR-Spektroskopiedatensätze eine Auswertung. Die Einführung ortsspezifischer Isotopenmarkierungen kann diese Informationsflut verringern, sodass man die Beiträge und die Umgebung einzelner Seitenketten auflösen kann. $^{13}\text{C}^{16}\text{O}$ - und $^{13}\text{C}^{18}\text{O}$ -Markierung der Seitenketten ermöglichen die Bestimmung von Kopplungskonstanten, z.B. innerhalb einer Helix.^[83] Dieser Ansatz wurde auf die gesamte Transmembranregion (27 Aminosäuren) eines menschlichen Membranproteins angewendet, indem die inhomogene Linienverbreiterung auf Fluktuationen in den unterschiedlichen Sektionen des Proteins innerhalb und außerhalb der Membran zurückgeführt wurde.^[84] Isotopenmarkierung kann ebenfalls dazu genutzt werden, Kopplungen in komplexen Systemen wie in Amyloidfibrillen, die in Form von Plaques in Hirngewebe von Alzheimerpatienten gefunden werden, zu entfernen.^[85] Die Abstände zwischen den Fibrillen wurden über die Kopplungskonstanten ermittelt. Die Bildung der Amyloidstruktur durch Aggregation kann direkt durch 2D-IR-Spektroskopie sichtbar gemacht werden, wodurch man Zugang zur Kinetik der Polypeptidaggregation mit seitenkettenspezifischer Auflösung und ohne externe Markierung erhält.^[86,87] In einer aktuellen Studie am M2-Kanal des Influenzavirus wurde empirisch die Abhängigkeit der Linienbreiten einer Reihe isotopenmarkierter Seitenkettencarbonyle innerhalb der Kanalpore genutzt, um Strukturinformationen über Rotationsbewegungen zu erhalten, die mit der Kanalschließung einhergehen.^[88] Bemerkenswert ist die erfolgreiche Untersuchung eines Membranproteins in einer naturähnlichen Umgebung, wodurch ein kritischer Vergleich der voneinander abweichenden Strukturen aus Festkörper-NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallstrukturanalyse möglich ist. Diese Entwicklung zeigt eindrucksvoll, dass 2D-IR-Spektroskopie bereits leistungsfähig genug ist, um biolo-

gische Schlüsselfragen zu beantworten, obwohl die Methode selbst erst am Beginn ihrer Entwicklung steht.

Der große Vorteil der 2D-IR-Spektroskopie liegt in der Möglichkeit, die Kinetik ultraschneller Prozesse mit räumlicher Auflösung zu untersuchen. Einen wesentlichen Forschungsschwerpunkt bildet dabei die Aufklärung von Proteinfaltungsprozessen. Die hohe räumliche Empfindlichkeit unterhalb der Angström-Skala wird dazu genutzt, kleinste Änderungen von Wasserstoffbrücken zu verfolgen, die mit dem Faltungsprozess einhergehen. Spektrale Überlagerungen verhindern die Auflösung dieser Änderungen mit konventioneller 1D-FT-IR-Spektroskopie. Die zusätzliche Dimension ermöglicht den Vergleich mit Moleküldynamik(MD)-Simulationen. Als direktes Ergebnis dieser Kombination von Theorie und Experiment konnte die Geschwindigkeit der Kontaktbildung von Proteinseitenketten von seinerzeit 20 ns^[89] auf derzeit 160 ps verbessert werden.^[90] Diese Befunde wurden durch Verfolgung der Wasserstoffbrückenstärke in kleinen Modellpeptiden mit einem β -Schleifenmotiv erhalten, das durch eine Disulfidbrücke stabilisiert wird. Der Entfaltungsprozess wurde dabei durch den Bruch der Disulfidbrücke mithilfe eines Femtosekunden-UV-Pulses ausgelöst. Beispielhaft für die Anwendung auf ein größeres System ist die Beobachtung der Entfaltungsdynamik von Ubiquitin nach einem Temperatursprung.^[91] Dabei ist die Aufklärung schneller Prozesse nicht nur auf den Amidbereich beschränkt – andere starke Oszillatoren wie CO können zur Verfolgung von Enzymkinetiken genutzt werden. So konnte der Austausch von Zwischenzuständen bei der Bindung von CO an Myoglobin über die Analyse der Kreuzkorrelationen untersucht werden.^[92] Die hohe Zeitauflösung der 2D-IR-Technik wurde anhand des Verlaufs des Austauschs mit einer Zeitkonstante von 50 ps gezeigt.^[93] Hamm und Andresen demonstrierten, dass die Selektivität der 2D-IR-Spektroskopie durch Differenzbildung weiter erhöht werden kann und wendeten diesen Ansatz auf ein bei der Methodenentwicklung beliebtes Modellprotein an, die lichtgetriebene Protonenpumpe Bacteriorhodopsin.^[94] Die Autoren verfolgten dabei nur diejenigen Schwingungen, die sich im Laufe der Reaktion veränderten. Mit diesem (bekannten) Kunstgriff der Differenzspektroskopie wird die 2D-IR-Spektroskopie auf einen wesentlich größeren Bereich des Schwingungsspektrums erweitert.

Schließlich wurde die 2D-IR-Technik mit der SFG-Spektroskopie (siehe Abschnitt 2.2) kombiniert. Ebenso wie die oben diskutierte SEIRAS wird die 2D-IR-Spektroskopie damit empfindlich bis hinunter zur Monoschichtebene unter Nutzung der Oberflächenauswahlregeln. Hierfür wird der Pulssequenz ein vierter Nah-IR-Puls beigemischt (SFG-2D-IR-Spektroskopie), wodurch das ausgestrahlte IR-Signal in den sichtbaren Bereich verschoben wird (Abbildung 2d).^[95] Außer der Oberflächenselektivität liefert diese Methode durch geeignete Polarisierung der Laserpulse auch die Möglichkeit zur Richtungsbestimmung von vor-orientierten Schwingungsdipolen. Diese Technik wurde bislang lediglich auf eine Dodecanol-Wasser-Grenzschicht angewendet,^[96] gilt jedoch als sehr aussichtsreicher Ansatz in Richtung komplexer Systeme.

Zusammenfassend liegt die Stärke der 2D-IR-Spektroskopie in der Kombination von Strukturempfindlichkeit mit inhärent hoher Zeitauflösung. Es sollte jedoch angemerkt werden, dass die Entfernung zweier Gruppen mit dieser Methode nur abgeschätzt werden kann. Die Zahl an Entfernungsparametern ist bei der 2D-IR-Spektroskopie deutlich geringer als bei der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie. Allerdings konnten Diederwinkel zwischen funktionellen Gruppen bestimmt werden, die sehr nützliche Parameter für die Strukturbestimmung sind. Die hohe Zeitauflösung der 2D-IR-Spektroskopie ermöglicht somit die Aufklärung von Reaktionsmechanismen unter Einschluss der Geometriebestimmung von Übergangszuständen^[97] im Pikosekundenbereich, der mit der NMR-Spektroskopie nicht zugänglich ist.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 613, K8 und D11 an J.H., FOR 526 an J.H. und T.K.) und dem PRESTO-Programm der Japan Science and Technology agency (an K.A.) unterstützt.

Eingegangen am 17. Dezember 2009

Online veröffentlicht am 16. Juni 2010

- [1] J. M. Zuo, M. Kim, M. O’Keeffe, J. C. H. Spence, *Nature* **1999**, 401, 49–52.
- [2] M. Hentschel, R. Kienberger, C. Spielmann, G. A. Reider, N. Milosevic, T. Brabec, P. Corkum, U. Heinzmann, M. Drescher, F. Krausz, *Nature* **2001**, 414, 509–513.
- [3] A. Yurtsever, A. H. Zewail, *Science* **2009**, 326, 708–712.
- [4] H. N. Chapman, S. P. Hau-Riege, M. J. Bogan, S. Bajt, A. Barty, S. Boutet, S. Marchesini, M. Frank, B. W. Woods, W. H. Benner, R. A. London, U. Rohner, A. Szoke, E. Spiller, T. Moller, C. Bostedt, D. A. Shapiro, M. Kuhlmann, R. Treusch, E. Plonjes, F. Burmeister, M. Bergh, C. Caleman, G. Hultdt, M. M. Seibert, J. Hajdu, *Nature* **2007**, 448, 676–679.
- [5] A. Ravasio, D. Gauthier, F. R. Maia, M. Billon, J. P. Caumes, D. Garzella, M. Geleoc, O. Gobert, J. F. Hergott, A. M. Pena, H. Perez, B. Carre, E. Bourhis, J. Gierak, A. Madouri, D. Mailly, B. Schiedt, M. Fajardo, J. Gautier, P. Zeitoun, P. H. Bucksbaum, J. Hajdu, H. Merdji, *Phys. Rev. Lett.* **2009**, 103, 028104.
- [6] U. Heugen, G. Schwaab, E. Brundermann, M. Heyden, X. Yu, D. M. Leitner, M. Havenith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 12301–12306.
- [7] D. F. Plusquellic, K. Siegrist, E. J. Heilweil, O. Esenturk, *ChemPhysChem* **2007**, 8, 2412–2431.
- [8] R. G. Greenler, *J. Chem. Phys.* **1966**, 44, 310–315.
- [9] W. Suetaka, J. T. Yates, *Surface Infrared and Raman Spectroscopy, Methods and Applications*, Plenum Press, New York, **1995**.
- [10] A. Bewick, K. Kunitatsu, J. W. Russell, C. Gibilaro, M. Razaq, *J. Electrochem. Soc.* **1982**, 129, C139.
- [11] A. Bewick, J. W. Russell, *J. Electroanal. Chem.* **1982**, 132, 329–344.
- [12] J. W. Russell, J. Overend, K. Scanlon, M. Severson, A. Bewick, *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 3066–3068.
- [13] Y. R. Shen, *Nature* **1989**, 337, 519–525.
- [14] G. Thakur, R. M. Leblanc, *Langmuir* **2009**, 25, 2842–2849.
- [15] A. Kouzayha, M. N. Nasir, R. Buchet, O. Wattraint, C. Sarazin, F. Besson, *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 7012–7019.
- [16] M. Osawa in *Handbook of Vibrational Spectroscopy, Vol. 1* (Hrsg.: J. M. Chalmers, P. R. Griffiths), Wiley, Chichester, **2002**, S. 785–799.
- [17] K. Ataka, J. Heberle, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 388, 47–54.

- [18] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103–1169.
- [19] G. Samjeske, A. Miki, M. Osawa, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 15074–15083.
- [20] A. Yamakata, T. Uchida, J. Kubota, M. Osawa, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 6423–6427.
- [21] K. Ataka, J. Heberle, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4986–4987.
- [22] K. Ataka, J. Heberle, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9445–9457.
- [23] N. Wisitruangsakul, I. Zebger, K. H. Ly, D. H. Murgida, S. Ek-gasit, P. Hildebrandt, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 5276–5286.
- [24] H. Krassen, S. Stripp, G. von Abendroth, K. Ataka, T. Happe, J. Heberle, *J. Biotechnol.* **2009**, *142*, 3–9.
- [25] N. Wisitruangsakul, O. Lenz, M. Ludwig, B. Friedrich, F. Lend-zian, P. Hildebrandt, I. Zebger, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 621–623; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 611–613.
- [26] H. Krassen, A. Schwarze, B. Friedrich, K. Ataka, O. Lenz, J. Heberle, *ACS Nano* **2009**, *3*, 4055–4061.
- [27] K. Ataka, F. Giess, W. Knoll, R. Naumann, S. Haber-Pohlmeier, B. Richter, J. Heberle, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16199–16206.
- [28] K. Ataka, B. Richter, J. Heberle, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 9339–9347.
- [29] X. Jiang, A. Zuber, J. Heberle, K. Ataka, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6381–6387.
- [30] X. Jiang, E. Zaitseva, M. Schmidt, F. Siebert, M. Engelhard, R. Schlesinger, K. Ataka, R. Vogel, J. Heberle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 12113–12117.
- [31] J. P. Busalmen, A. Esteve-Nunez, A. Berna, J. M. Feliu, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4952–4955; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4874–4877.
- [32] J. P. Busalmen, A. Berna, J. M. Feliu, *Langmuir* **2007**, *23*, 6459–6466.
- [33] N. Bloembergen, R. K. Chang, S. S. Jha, C. H. Lee, *Phys. Rev.* **1968**, *174*, 813–822.
- [34] C. C. Wang, *Phys. Rev.* **1969**, *178*, 1457–1460.
- [35] X. D. Zhu, H. Suhr, Y. R. Shen, *Phys. Rev. B* **1987**, *35*, 3047–3050.
- [36] J. H. Hunt, P. Guyotsionnest, Y. R. Shen, *Chem. Phys. Lett.* **1987**, *133*, 189–192.
- [37] O. Mermut, D. C. Phillips, R. L. York, K. R. Mccrea, R. S. Ward, G. A. Somorjai, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3598–3607.
- [38] A. Peremans, A. Tadjeddine, *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 7197–7203.
- [39] J. Wang, M. A. Even, X. Y. Chen, A. H. Schmaier, J. H. Waite, Z. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9914–9915.
- [40] M. Bonn, H. Ueba, M. Wolf, *J. Phys.* **2005**, *17*, S201–S220.
- [41] I. V. Stiopkin, H. D. Jayathilake, A. N. Bordenyuk, A. V. Ben-derskii, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2271–2275.
- [42] P. B. Miranda, Y. R. Shen, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 3292–3307.
- [43] M. L. Clarke, J. Wang, Z. Chen, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 22027–22035.
- [44] J. Wang, S. H. Lee, Z. Chen, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2281–2290.
- [45] X. Y. Chen, J. Wang, A. P. Boughton, C. B. Kristalyn, Z. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1420–1427.
- [46] M. A. Even, J. Wang, Z. Chen, *Langmuir* **2008**, *24*, 5795–5801.
- [47] X. Y. Chen, A. P. Boughton, J. J. G. Tesmer, Z. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12658–12659.
- [48] F. Keilmann, *Vib. Spectrosc.* **2002**, *29*, 109–114.
- [49] B. Knoll, F. Keilmann, *Nature* **1999**, *399*, 134–137.
- [50] B. Knoll, F. Keilmann, *Appl. Phys. A* **1998**, *66*, 477–481.
- [51] I. Kopf, J. S. Samson, G. Wollny, C. Grunwald, E. Brundermann, M. Havenith, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 8166–8171.
- [52] J. Steidtner, B. Pettinger, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 236101.
- [53] R. M. Stöckle, Y. D. Suh, V. Deckert, R. Zenobi, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *318*, 131–136.
- [54] R. B. Dyer, F. Gai, W. H. Woodruff, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 709–716.
- [55] W. Uhmman, A. Becker, C. Taran, F. Siebert, *Appl. Spectrosc.* **1991**, *45*, 390–397.
- [56] I. Radu, M. Schleege, C. Bolwien, J. Heberle, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 1517–1528.
- [57] F. Garczarek, K. Gerwert, *Nature* **2006**, *439*, 109–112.
- [58] T. Majerus, T. Kottke, W. Laan, K. Hellingwerf, J. Heberle, *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 1787–1789.
- [59] A. Pfeifer, T. Majerus, K. Zikihara, D. Matsuoka, S. Tokutomi, J. Heberle, T. Kottke, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 1462–1470.
- [60] M. T. Alexandre, D. C. Luhrs, I. van Stokkum, R. Hiller, M. L. Groot, J. T. Kennis, R. van Grondelle, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 2118–2128.
- [61] V. Sivakumar, R. Wang, G. Hastings, *Biochemistry* **2005**, *44*, 1880–1893.
- [62] G. Hastings, K. M. Bandaranayake, E. Carrion, *Biophys. J.* **2008**, *94*, 4383–4392.
- [63] R. Efremov, V. I. Gordeliy, J. Heberle, G. Büldt, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 1441–1451.
- [64] J. N. Moore, P. A. Hansen, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5062–5066.
- [65] P. Hamm, M. Zurek, W. Mäntele, M. Meyer, H. Scheer, W. Zinth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 1826–1830.
- [66] R. W. Schoenlein, L. A. Peteanu, R. A. Mathies, C. V. Shank, *Science* **1991**, *254*, 412–415.
- [67] J. Herbst, K. Heyne, R. Diller, *Science* **2002**, *297*, 822–825.
- [68] J. J. van Thor, K. L. Ronayne, M. Towrie, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 126–132.
- [69] C. Schumann, R. Gross, M. M. Wolf, R. Diller, N. Michael, T. Lamparter, *Biophys. J.* **2008**, *94*, 3189–3197.
- [70] L. J. van Wilderen, M. A. van der Horst, I. van Stokkum, K. J. Hellingwerf, R. van Grondelle, M. L. Groot, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15050–15055.
- [71] A. L. Stelling, K. L. Ronayne, J. Nappa, P. J. Tonge, S. R. Meech, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15556–15564.
- [72] P. Hamm, M. H. Lim, R. M. Hochstrasser, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 6123–6138.
- [73] M. C. Asplund, M. T. Zanni, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8219–8224.
- [74] M. T. Zanni, R. M. Hochstrasser, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 516–522.
- [75] M. T. Zanni, S. Gnanakaran, J. Stenger, R. M. Hochstrasser, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 6520–6535.
- [76] P. Hamm, M. Lim, W. F. DeGrado, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 2036–2041.
- [77] S. Woutersen, P. Hamm, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 11316–11320.
- [78] M. T. Zanni, N. H. Ge, Y. S. Kim, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11265–11270.
- [79] N. Demirdöven, C. M. Cheatum, H. S. Chung, M. Khalil, J. Knoester, A. Tokmakoff, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7981–7990.
- [80] H. Maekawa, F. Formaggio, C. Toniolo, N. H. Ge, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6556–6566.
- [81] H. Maekawa, C. Toniolo, Q. B. Broxterman, N. H. Ge, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 3222–3235.
- [82] L. P. Deflores, Z. Ganim, R. A. Nicodemus, A. Tokmakoff, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3385–3391.
- [83] C. Fang, J. Wang, Y. S. Kim, A. K. Charnley, W. Barber-Armstrong, A. B. Smith, S. M. Decatur, R. M. Hochstrasser, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 10415–10427.
- [84] P. Mukherjee, I. Kass, I. T. Arkin, M. T. Zanni, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 3528–3533.

- [85] Y. S. Kim, L. Liu, P. H. Axelsen, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 7720–7725.
- [86] D. B. Strasfeld, Y. L. Ling, S. H. Shim, M. T. Zanni, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6698–6699.
- [87] S. H. Shim, R. Gupta, Y. L. Ling, D. B. Strasfeld, D. P. Raleigh, M. T. Zanni, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 6614–6619.
- [88] J. Manor, P. Mukherjee, Y. S. Lin, H. Leonov, J. L. Skinner, M. T. Zanni, I. T. Arkin, *Structure* **2009**, *17*, 247–254.
- [89] O. Bieri, J. Wirz, B. Hellrung, M. Schutkowski, M. Drewello, T. Kiefhaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9597–9601.
- [90] C. Kolano, J. Helbing, M. Kozinski, W. Sander, P. Hamm, *Nature* **2006**, *444*, 469–472.
- [91] H. S. Chung, Z. Ganim, K. C. Jones, A. Tokmakoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14237–14242.
- [92] J. Bredenbeck, J. Helbing, K. Nienhaus, G. U. Nienhaus, P. Hamm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14243–14248.
- [93] H. Ishikawa, K. Kwak, J. K. Chung, S. Kim, M. D. Fayer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 8619–8624.
- [94] E. R. Andresen, P. Hamm, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6520–6527.
- [95] A. Ghosh, M. Smits, J. Bredenbeck, N. Dijkhuizen, M. Bonn, *Rev. Sci. Instrum.* **2008**, *79*, 093907.
- [96] J. Bredenbeck, A. Ghosh, M. Smits, M. Bonn, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2152–2153.
- [97] J. F. Cahoon, K. R. Sawyer, J. P. Schlegel, C. B. Harris, *Science* **2008**, *319*, 1820–1823.

Neugierig?



Sachbücher von WILEY-VCH

GERHARD GOTTSCHALK

Welt der Bakterien**Die unsichtbaren Beherrscher
unseres Planeten**

ISBN: 978-3527-32520-7

April 2009 274 S. mit 75 Abb., davon

49 in Farbe Broschur € 24,90

Gerhard Gottschalks Buch gibt überraschende Einblicke in die erstaunliche Welt der Bakterien. Diese Mikroorganismen haben unsere Erde in einem Ausmaß verändert, wie keine andere Lebensform und sie zu dem Planeten gemacht, auf dem wir leben können. Jedoch haben Bakterien auch ihre „schlechten“ Seiten: Sie verursachen Krankheiten und produzieren die stärksten Gifte, die es überhaupt gibt.

Was Sie schon immer über Bakterien wissen wollten und nie zu fragen wagten; was es an faszinierenden Leistungen dieser Kleinstlebewesen zu bestaunen gibt, das beschreibt einer der bekanntesten Mikrobiologen unserer Zeit.



WILEY-VCH

Wiley-VCH • Tel. +49 (0) 62 01-606-400 • Fax +49 (0) 62 01-606-184 • E-Mail: service@wiley-vch.de

www.wiley-vch.de/sachbuch