

Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6428

**Methodenentwicklung für die
FTIR-Differenzspektroskopie von
Protein-Ligand-Wechselwirkungen**

K. Fuchsle

Institut für Instrumentelle Analytik

Februar 2000

Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6428

Methodenentwicklung für die
FTIR-Differenzspektroskopie von
Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Kathrin Fücksle

Institut für Instrumentelle Analytik

vom Fachbereich Physik der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
2000

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor
Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe
Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)
ISSN 0947-8620

Methodenentwicklung für die FTIR-Differenzspektroskopie von Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Zusammenfassung

Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Entwicklung eines universellen Verfahrens zur FTIR-differenzspektroskopischen Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen und die Untersuchung der Einsatzmöglichkeiten dieses Verfahrens für das Arzneimittelscreening. Um eine möglichst große Universalität zu erreichen, wurde das Verfahren der statischen Differenzbildung entwickelt. Dabei wird das Differenzspektrum aus getrennten Lösungen von Komplex, Protein und Ligand berechnet. Da wäßrige Proteinlösungen verwendet werden sollen, kann nur mit Schichtdicken kleiner als 12 µm gearbeitet werden.

Um die verschiedenen Lösungen in die Infrarotmeßzelle transportieren zu können, wurde ein Flußsystem aus Probenschleife, Pumpe und Zelle entwickelt und dieses charakterisiert. Die durch hohe Drücke und Dispersion auftretenden Probleme wurden gelöst bzw. reduziert.

An dem Modellsystem Trypsin konnte gezeigt werden, daß eine Unterscheidung zwischen bindenden und nicht-bindenden Substanzen möglich ist. Diese Differenzspektren besitzen bei bindenden Substanzen, wie Benzamidin, Leupeptin, Propionyl-Leupeptin, deutliche und reproduzierbare Banden, während nicht-bindende Substanzen, wie Benzoesäure und Hydrozimsäure, zu einer Basislinie führen. Die Signalqualität entspricht der licht- bzw. redoxinduzierten Differenzspektroskopie. Neben einfachen Komplexbildungen können auch Verdrängungsreaktionen FTIR-differenzspektroskopisch beobachtet werden. Die erhaltenen Spektren ermöglichen Aussagen über Art, Ort und molekulares Geschehen bei der Bindung.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurden zwei Möglichkeiten zur Automatisierung des entwickelten Verfahrens im Hinblick auf einen Einsatz im High-Throughput-Screening der Arzneimittelforschung erprobt.

Bei der Mischmethode werden 50:50 Mischungen zwischen Protein und Ligand einerseits und Protein und Puffer andererseits hergestellt und verglichen. Unbedingte Voraussetzung ist dabei eine gute Reproduzierbarkeit des Mischungsverhältnisses. Die Auswirkungen des Einsatzes unterschiedlicher Pumpensysteme und Mischer auf die Reproduzierbarkeit des Mischungsverhältnisses wurde getestet.

Als zweites Verfahren wurde eine Drei-Kammer-Zelle entwickelt. Diese Zelle besitzt zwei planparallele Kammern, die gleichzeitig von dem Infrarotstrahl durchstrahlt werden. Auf diese Weise läßt sich ein Summenspektrum Protein plus Ligand messen. Das Spektrum der Mischung bzw. des Komplexes wird in einer dritten Kammer gemessen. Der Prototyp einer solchen Zelle wurde aus Silizium mit Hilfe mikrosystemtechnischer Verfahren hergestellt und getestet.

New methods for FTIR difference spectroscopy of protein ligand interactions

Abstract

In this work, a universal method for FTIR difference spectroscopic studies of protein ligand interactions was developed and tested for its suitability for pharmaceutical drug screening. In order for the method to be universally applicable it is based on static difference spectroscopy, calculating the difference spectrum from separate solutions of complex, protein and ligand. This static difference method is highly reproducible. Since aqueous solutions should be used the optical pathlength may not exceed 12 μm .

A flow system, consisting of sample loops, pump and cell, was developed to transport the different solutions into the measuring cell. Problems arising from high pressure and sample dispersion were solved or reduced.

Using trypsin as a model substance it could be shown that distinction between binding and non-binding substances is possible. Difference spectra of binding substances, such as benzamidine, leupeptin and propionyl-leupeptin, show clear reproducible bands. In contrast non-binding substances, e.g. benzoic acid and hydrocinnamic acid, lead to a baseline devoid of signals. Signal quality is comparable to light- and redox-induced spectra. The spectra recorded give insights into type, site and molecular mechanism of binding.

In the second part of this work two possibilities for automated processes are tested for their suitability high throughput pharmaceutical screening.

The mixing method compares 50:50 mixtures of protein and ligand on the one hand and of protein and buffer on the other. A high reproducibility of the mixing ratio is required for this method to work. Therefore the effect of different pumps and mixer on the mixing ratio was tested.

Another possibility is the three-chamber-cell. This cell incorporates two parallel chambers, through which the IR beam passes simultaneously. This way a spectrum of both protein and ligand can be measured without mixing both substances. The spectrum of the mixture or the complex is measured in a third chamber. A prototype of this cell was manufactured and tested using microstructuring techniques in silicon.

1	Einleitung	1
1.1	Bedeutung und Art von Protein-Ligand-Wechselwirkungen	1
1.2	Methoden zur Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen	3
1.3	Aufgabenstellung	5
2	Spektroskopie	7
2.1	UV/VIS-Spektroskopie	7
2.2	FTIR-Spektroskopie	7
2.3	Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie	9
2.3.1	<i>Rapid Scan</i> Methode	10
2.3.2	Stroboskopmethode	11
2.3.3	<i>Step Scan</i> Methode	11
2.3.4	Kinetik bei einzelnen Wellenlängen	12
2.4	Infrarotspektroskopie an Proteinen	12
2.4.1	Messungen in wäßrigen Lösungen	12
2.4.2	Bandenzuordnung bei Proteinen	13
2.5	FTIR-Differenzspektroskopie	16
2.6	Methoden	19
2.6.1	UV/VIS-Spektroskopie	19
2.6.2	FTIR-Spektroskopie	19
3	Flußsystem Grundlagen und Realisierung	21
3.1	Bekannte Flußsysteme für die FTIR-Spektroskopie	21
3.2	Grundlagen der Strömungslehre	22
3.2.1	Laminare und turbulente Strömung	23
3.2.2	Geschwindigkeitsprofil und Dispersion bei laminaren Strömungen	24
3.2.3	Druckabfall in laminar durchströmten Systemen	29
3.3	Realisierung des Flußsystems	33
3.3.1	Zellen	33
3.3.2	Transmissionszelle	34
3.3.3	ATR-Zelle	35

3.3.4	Aufbau des Flußsystem	37
3.3.4.1	Layout des Flußsystems	37
3.3.4.2	Charakterisierung	40
3.3.5	Verbesserungen am Flußsystem	43
3.3.5.1	Verbesserung der Signalstabilität	43
3.3.5.2	Reduktion des Probenverbrauchs	45
3.3.6	Ergebnisse	46
4	Erprobung des Verfahrens an Trypsin als Modellsystem	48
4.1	Grundlagen	48
4.2	Untersuchte Liganden und deren Bindung an Trypsin	50
4.3	Methode zur Aufnahme der Differenzspektren	53
4.4	Stabilisierung von Trypsin gegen Autolyse	56
4.5	Untersuchungen an Trypsin-Komplexen	59
4.5.1	Benzamidin	59
4.5.2	Benzoessäure und Hydrozimsäure	62
4.5.3	Leupeptin und Propionyl-Leupeptin	63
4.6	Vergleich der unterschiedlichen Liganden	64
4.7	Verdrängung von Benzamidin durch Leupeptin	65
4.8	Reproduzierbarkeit der Spektren	67
4.9	Einfluß des Lösungsmittels	67
4.9.1	Wirkung von DMSO auf Proteine	67
4.9.2	Differenzspektren bei unterschiedlichen DMSO Gehalt	70
4.10	Ergebnisse	70
5	Möglichkeiten zur Automatisierung	72
5.1	Kinetik der Reaktion zwischen Protein und Ligand	73
5.2	Unterschiedliche Meßverfahren	75
6	Mischmethode	81
6.1	Vorgehensweise	81

6.2	Ergebnisse	83
6.2.1	HPLC-Pumpe und T-Stück	83
6.2.2	Zwei Spritzenpumpen und T-Stück	85
6.2.3	Zwei Spritzenpumpen und Mikromischer	86
6.2.4	Doppelspritzenpumpe und T-Stück	87
6.3	Vergleich der verschiedenen Systeme	88
6.4	Messungen mit der Mischmethode	89
7	Drei-Kammer-Zelle: Realisierung und Ergebnisse	91
7.1	Anforderungen	91
7.2	Design der Maske	92
7.3	Vorgehensweise bei der Siliziumstrukturierung	93
7.4	Ätzverfahren für Silizium	94
7.4.1	Grundlagen	94
7.4.2	Reaktives Trockenätzen mit Brom- Fluorgas	94
7.4.3	Ergebnisse der Ätzversuche	96
7.5	Laserschneiden der Verbindungskanäle	101
7.6	Messungen mit der Drei-Kammer-Zelle	104
7.6.1	Aufbau	104
7.6.2	Messungen in den getrennten Kammern	105
7.6.3	Messungen in der gemeinsamen Kammer.	106
7.6.4	Optische Effekte bei der Differenzbildung	108
7.7	Schlußfolgerungen	111
8	Diskussion der Ergebnisse	113
9	Zusammenfassung	117
10	Literaturverzeichnis	119
11	Anhang	127
11.1	Verwendete Chemikalien	127
11.2	Geräte	127
11.3	FTIR-Meßparameter und Bearbeitung der Spektren	128

Abbildung 1-1	<i>Schema der kompetitiven und nicht-kompetitiven reversiblen Hemmung.</i>	2
Abbildung 2-1	<i>Schematische Darstellung eines FTIR-Spektrometers.</i>	8
Abbildung 2-2	<i>Schematische Darstellung der Rapid Scan Methode.</i>	10
Abbildung 2-3	<i>Schematische Darstellung der Stroboskopmethode nach (Souvignier u. Gerwert 1992).</i>	11
Abbildung 2-4	<i>Schematische Darstellung der Step Scan Methode.</i>	12
Abbildung 2-5	<i>Das obere Bild zeigt den Vergleich der Absorptionsspektren von Trypsin (—) und dem Trypsin-Benzamidin-Komplex (- · -) mit ihrer Differenz (- -). Die Differenz ist im unteren Bild vergrößert dargestellt. Sie entspricht den Änderungen der IR-Absorption durch die Komplexbildung.</i>	18
Abbildung 3-1	<i>Stopped-Flow-System bestehend aus zwei angetriebenen Spritzen, einem Mischer, einer Meßzelle und der Stopspritze.</i>	21
Abbildung 3-2	<i>Verteilung der Probe in der zur Zeit t_0 (oben) und nach einer Zeit t_1 (Mitte) bzw. t_2 in der Kapillare (unten). Durch den laminaren Fluß erhält man eine parabolische Verteilung der Probe.</i>	25
Abbildung 3-3	<i>Ausbildung konzentrischer Ringe zur Zeit t am Ende des Kapillarrohrs mit Länge L und Radius R.</i>	26
Abbildung 3-4	<i>Vergleich des gemessenen Strömungsprofils (durchgezogene Linie) mit dem nach Gleichung 3-3 berechneten (gestrichelte Linie). $r=0.1524$ mm (0.006"), $V_{\text{Probe}}=50$ μl, $V_{\text{Zelle}}=(5$ mm)²·π·10 μm entsprechend dem durchstrahlten Volumen, $\bar{V}=8.33$ $\mu\text{l/s}$, $\tau_1=0.6$ s, $\tau_2=6.6$ s.</i>	28
Abbildung 3-5	<i>Abhängigkeit des Druckabfalls von der Länge L der Zelle (rechtes Diagramm): mit $L=10$ mm (—), 26 mm (- -) und 50 mm (- · -) sowie von der Schichtdicke b (linkes Diagramm): mit $b=5$ μm (—), 10 μm (- -) und 15 μm (- · -).</i>	31
Abbildung 3-6	<i>Prinzipien zur FTIR-Spektroskopie an Flüssigkeiten.</i>	33
Abbildung 3-7	<i>Skizze der verwendeten Zelle (Fa. Spectra Tech). a: Gehäuse, b,f: Teflondichtungen, c: CaF₂-Fenster, d: Spacer, e: CaF₂-Fenster mit Bohrungen, g: Nadelplatte, h: Kompressionsring.</i>	34
Abbildung 3-8	<i>Das Prinzip der verwendeten ATR-Zelle.</i>	35

- Abbildung 3-9** Adsorption von Cytochrom *c* oxidiert $c = 4 \text{ mM}$ an den ATR-Kristall. Zunahme der Absorption nach dem Stoppen. 36
- Abbildung 3-10** Aufbau des Flußsystems. Dargestellt sind alle Schaltungen des Zyklus. 39
- Abbildung 3-11** Druckabfall im Flußsystem beim Pumpen mit unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten V mit (○) und ohne Zelle (■). 40
- Abbildung 3-12** Flußprofil in der Zelle nach Einspritzen von $500 \mu\text{l}$ 50 mM Ferricyanidlösung (◆). Beim Stoppen des Flusses kommt es zu einem Drucksprung im System, der eine Vergrößerung der Schichtdicke und deshalb eine größere Absorption zur Folge hat (○). $\lambda_{\text{max}}(\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]) = 418.4 \text{ nm}$. Die Pfeile markieren die Abnahme des Signals durch den Kolbenhub. 41
- Abbildung 3-13** Bestimmung der Stopzeit des Systems nach dem Einspritzen von 250 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. $\lambda_{\text{max}}(\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]) = 418.4 \text{ nm}$. Exponentieller Fit der Meßdaten. 42
- Abbildung 3-14** Modifikation des Flußsystems zur Verbesserung der Signalstabilität. Gezeigt ist das System während der Messung mit Kurzschluß (oben) und mit offen geschalteter Zelle (unten). Der Druck in der Zelle beträgt 10^5 Pa . 43
- Abbildung 3-15** Abnahme des Signals nach dem Stop bei 4.5 s in dem modifizierten Flußsystem. 0.1 M $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ Absorption bei $\tilde{\nu} = 2036 \text{ cm}^{-1}$. 44
- Abbildung 3-16** Reduktion der Dispersion durch Verwendung von Kapillaren mit 0.0762 mm (durchgezogene Linie) anstelle von 0.254 mm Innenradius (gestrichelte Linie) bei einem Probenvolumen von $410 \mu\text{l}$. Absorption von 0.1 M $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $\tilde{\nu} = 2039 \text{ cm}^{-1}$. 45
- Abbildung 3-17** Strömungsprofil mit einem Probenschleifenvolumen von $50 \mu\text{l}$. Absorption von 0.1 M $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $\tilde{\nu} = 2039 \text{ cm}^{-1}$. 46
- Abbildung 4-1** Katalytischer Mechanismus der Serinproteasen. 49
- Abbildung 4-2** Nomenklatur der Proteaseuntereinheiten nach Schechter und Berger (Schechter u. Berger 1967) 50
- Abbildung 4-3** Chemische Formel und Namen aller untersuchten Trypsin-Liganden. Dabei binden Leupeptin, Propionyl-Leupeptin und Benzamidin an Trypsin. Hydrozimtsäure und Benzoessäure binden nicht. 51

- Abbildung 4-4** Kristallstruktur des Trypsin-Leupeptin-Komplexes (Kurinov u. Harrison 1996). Die Aminosäurereste des aktiven Zentrums Ser¹⁹⁵, Asp¹⁰² und His⁵⁷ sowie der für die Substratspezifität verantwortliche Rest Asp¹⁸⁹ und der Ligand Leupeptin sind hervorgehoben. 52
- Abbildung 4-5** Verfahren der statischen Differenzbildung für die Versuche zur differenzspektroskopischen Untersuchung von Protein-Ligand-Komplexen am Beispiel von Trypsin. 54
- Abbildung 4-6** Stufen der Autolyse von Rindertrypsin (Prestrelski et al. 1991). 57
- Abbildung 4-7** Vergleich des statischen Differenzspektrums zwischen Trypsin und seinem Komplex mit Leupeptin (durchgezogene Linie) und der spontanen Absorptionsänderung einer ungehemmten Trypsin-Lösung über 10 Minuten Inkubation (gestrichelte Linie). 58
- Abbildung 4-8** Stabilisierung von Trypsin gegen Autolyse gezeigt am Verlauf der Absorption bei 1583 cm⁻¹ (Maximum einer Bande in Abbildung 4-7). Die Stabilisierung wurde erreicht durch Zugabe von 11 mM Benzamidin bzw. 100 mM Ca²⁺. 59
- Abbildung 4-9** Darstellung aller für die Berechnung des Benzamidin-Differenzspektrums verwendeten Spektren und der Basislinie (Trypsin gegen Trypsin). 60
- Abbildung 4-10** Vergleich des Differenzspektrums der Komplexbildung von Trypsin mit Benzamidin (durchgezogene Linie) mit dem Differenzspektrum der Autolyse des Trypsins (gestrichelte Linie). Dieses wurde willkürlich skaliert, um vergleichbare Banden hervorzuheben. 61
- Abbildung 4-11** Darstellung aller für die Berechnung des Benzoessäure-Differenzspektrums verwendeten Spektren und der Basislinie (Trypsin gegen Trypsin). 62
- Abbildung 4-12** Differenzspektren für die Komplexbildung mit Leupeptin (durchgezogene Linie) und Propionyl-Leupeptin (gestrichelte Linie). 63
- Abbildung 4-13** Vergleich der Differenzspektren für die Komplexbildung mit den unterschiedlichen Liganden. 64
- Abbildung 4-14** Vergleich des gemessenen Differenzspektrums der Verdrängungsreaktion von Benzamidin durch Leupeptin (oben) mit dem aus der Differenz der beiden Einzelspektren berechneten (zweite Reihe). Die beiden Einzelspektren sind zur besseren Verständlichkeit ebenfalls gezeigt. 66
- Abbildung 4-15** Reproduzierbarkeit der Spektren für den Trypsin-Benzamidin-Komplex. Dargestellt sind zwei Spektren aus unterschiedlichen Versuchsreihen. 67

- Abbildung 4-16** *Einfluß von DMSO auf die Differenzspektren des Benzamidin-Komplexes.* 70
- Abbildung 5-1** *Schema der kinetischen Meßmethode für die FTIR-Differenzspektroskopie.* 73
- Abbildung 5-2** *Konzentrationsverlauf der Edukte und des Produktes während der Komplexbildung von Avidin mit Biotin bei einer Ausgangskonzentration von 1 mM beider Edukte.* 75
- Abbildung 5-3** *Schematische Darstellung der Streifenmethode zur Verschiebung der Kinetik in das Diffusionsregime.* 76
- Abbildung 5-4** *Änderung der gemessenen Intensität durch die Diffusion bei der Streifenmethode. Dargestellt ist die Mischung eines einzelnen Reagenzes mit dem gleichen Volumen einer nichtabsorbierenden Lösung. Ausgangsintensität des Strahls: I_0 . Die Intensität nach den getrennten Lösungen $I_{\text{ges,Streifen}}$ ist nur gleich der Intensität nach der Mischung $I_{\text{ges,gem}}$, wenn $10^{-A} = 1$, also $A = 0$, d. h. der Strahl wird nicht absorbiert.* 77
- Abbildung 5-5** *Schema der Mischmethode zur FTIR-Differenzspektroskopie von Protein-Ligand-Wechselwirkungen.* 78
- Abbildung 5-6** *Schema der neu entwickelten Zelle mit zwei getrennten Kammern für die erste Messung.* 79
- Abbildung 6-1** *Modifiziertes Flußsystem für das Mischen zwei verschiedener Lösungen. Gezeigt ist das System bei gestopptem Fluß zur Meßzelle während der Messung.* 81
- Abbildung 6-2** *Modifikation des Flußsystems für die Verwendung von zwei Pumpen.* 82
- Abbildung 6-3** *Mischprinzip des eingesetzten T-Stücks.* 84
- Abbildung 6-4** *Strömungsprofil in der Apparatur mit HPLC-Pumpe und T-Stück, $K_4[Fe(CN)_6]$ ○ und $K_3[Fe(CN)_6]$ ●.* 85
- Abbildung 6-5** *Prinzip des diffusiven Mikromischers (Ehrfeld et al. 1999).* 86
- Abbildung 6-6** *Vergleich des Mischungsverhältnisses und der Standardabweichungen für die unterschiedlichen Systeme (jeweils mit dem T-Stück als Mischer).* 88

- Abbildung 6-7** Vergleich des mittels der Mischmethode (oben) gemessenen Differenzspektrums der Komplexbildung von Trypsin mit Benzamidin mit den Spektren der statischen Versuche ohne (Mitte) und mit (unten) DMSO. 89
- Abbildung 7-1** Maske für die Strukturierung der Wafer (Maßstab 1:1). 92
- Abbildung 7-2** Aufbau einer Zelle aus vier Einzelteilen. Die Bohrungen zur Verbindung der Kammern sind ebenfalls gezeigt. 92
- Abbildung 7-3** Vorgehensweise bei der optischen Kontaktbelichtung zur Strukturierung der Oxidschicht. 93
- Abbildung 7-4** Charakteristische IR-Banden der Gase BrF_3 , BrF und BrF_5 (links) sowie SiF_4 rechts). 95
- Abbildung 7-5** Verlauf der Partialdrücke für BrF_3 (○) und SiF_4 (◆) während eines Ätzvorgangs mit $2 \cdot 10^2$ Pa Br_2 , $6 \cdot 10^2$ Pa F_2 und $9.92 \cdot 10^4$ Pa Xenon. 96
- Abbildung 7-6** Profil einer geätzten Fläche (links) mit Vergrößerung des Randbereichs (rechts). 97
- Abbildung 7-7** 3D-Tastschnitt-Profil der geätzten Oberfläche. 97
- Abbildung 7-8** Entstehung des typischen Ätzprofils aufgrund der Anreicherung von Ätzgas über der Maske. 98
- Abbildung 7-9** Vergleich der Tastschnitt-Profile von vier verschiedenen Rauten eines Wafers. 99
- Abbildung 7-10** REM-Aufnahmen der geätzten Strukturen vor dem Entfernen der SiO_2 -Maske. Im rechten Bild ist die Unterätzung der Maske zu erkennen. Außerdem erkennt man rechts einige Unebenheiten auf der Oberfläche. 100
- Abbildung 7-11** REM-Aufnahmen der Oberfläche der geätzten Strukturen vor (links) und nach (rechts) dem Sputterätzen im Sauerstoffplasma. Auch die Rauheit der Oberfläche nimmt durch die Entfernung der kohlenstoffhaltigen Schicht ab. 101
- Abbildung 7-12** Löcher durch den Wafer nach dem Bohren (links) und nach dem SiO_2 -Ätzen und der Entfernung der Resistschicht (rechts). Die Stellen außerhalb der Struktur sind frei von heraus geschleuderten Teilchen, und kleinere Teilchen innerhalb der Struktur wurden während des SiO_2 -Ätzens ebenfalls entfernt. 101
- Abbildung 7-13** Gesamter Prozeß zur Strukturierung der Wafer. 102

- Abbildung 7-14** *Zusammengebaute Siliziumzelle mit a: Gehäuse, b: Deckel, c: intern/extern-HPLC-Verbindung, d: Kapillare, e: O-Ring, f: Siliziumplättchen, g: Meßstelle für Summe der Reagenzien, h: Meßstelle für Mischung (nicht maßstabsgetreu).* 104
- Abbildung 7-15** *Strömungsprofile nach dem Einspritzen von jeweils 50 µl $K_4[Fe(CN)_6]$ (○) und 0.1 M $K_3[Fe(CN)_6]$ (■) in die getrennten Kammern der Siliziumzelle.* 105
- Abbildung 7-16** *Strömungsprofile nach dem Einspritzen von jeweils 50 µl $K_4[Fe(CN)_6]$ (○) und 0.1 M $K_3[Fe(CN)_6]$ (■) in die gemeinsame Kammer der Siliziumzelle.* 107
- Abbildung 7-17** *Skizze der beiden nebeneinander fließenden Lösungen.* 107
- Abbildung 7-18** *Weg eines Strahls durch zwei planparallele Fenster. Reflexion führt zu den Strahlen R_1 und R_2 . Die beiden Strahlen D_1 und D_2 überlagern sich. Je nach Wellenlänge und Wegdifferenz kommt es zu konstruktiver oder destruktiver Interferenz.* 108
- Abbildung 7-19** *Absorptionsspektren 0.2 M Acetat-Puffer pH = 3.8 mit Wasser als Referenz in den getrennten Kammern (durchgezogene Linie) und der gemeinsamen Kammer (gepunktete Linie) der Siliziumzelle. Der zur Auswertung verwendete Bereich zwischen 6000 und 4000 cm^{-1} ist links, die Absorptionsbanden sind rechts dargestellt.* 109
- Abbildung 7-20** *Differenzspektren von 0.2 M Acetat-Puffer [pH = 5.6]-[pH = 3.8] in den getrennten Kammern (durchgezogene Linie) und der gemeinsamen Kammer (gepunktete Linie) der Siliziumzelle. Der zur Auswertung verwendete Bereich zwischen 6000 und 4000 cm^{-1} ist links, die Differenzbanden sind rechts dargestellt.* 110
- Abbildung 7-21** *Differenz zwischen den Spektren von Acetat [pH 5.6]-[pH 3.8] aus der gemeinsamen Kammer und aus den getrennten Kammern.* 111

1 Einleitung

Protein-Ligand-Wechselwirkungen sind essentiell für die Funktion der meisten bekannten Proteine. Sie sind verantwortlich für die enzymatische Transformation, den Substanztransport, die Signalübertragung sowie die Regulation. Dabei ist die molekulare Erkennung verantwortlich für die selektive Bindung eines niedermolekularen Liganden an das entsprechende Protein. Aufgrund der weitreichenden Bedeutung dieser Wechselwirkungen spielt die Untersuchung von Protein-Ligand-Komplexen eine wesentliche Rolle in der biochemischen, biophysikalischen und pharmazeutischen Forschung.

1.1 Bedeutung und Art von Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Protein-Ligand-Wechselwirkungen sind die wesentliche Ursache für die katalytische Wirkung von Enzymen. Durch die Wechselwirkungen des Enzyms mit dem Substrat werden Kräfte ausgeübt, die die Struktur des Substrats in die Nähe der Struktur des Übergangszustands bringen und so die Aktivierungsenergie herabsetzen. Das Substrat wird dabei häufig so gebunden, daß seine reaktive Bindung in der Nähe des aktiven Zentrums liegt und zu dieser ausgerichtet ist. Teile des Enzyms können direkt an der Reaktion teilnehmen. Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat können daher Informationen über den Mechanismus einer enzymatischen Reaktion liefern.

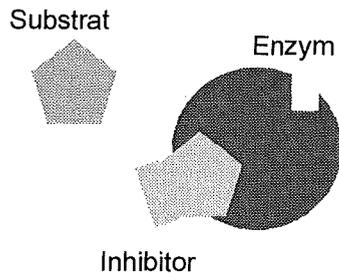
Eine weitere wichtige Rolle spielen Protein-Ligand-Wechselwirkungen bei der Signaltransduktion. Durch die Bindung des Botenstoffs an den Rezeptor kommt es zur Übertragung eines Signals. Auch hier lassen Untersuchungen der Wechselwirkungen Rückschlüsse auf den Mechanismus der Signalübertragung zu.

Viele physiologische Prozesse werden über Hemmstoffe reguliert. Diese Inhibitoren können entweder körpereigene Substanzen sein oder sie werden als Arzneimittel zur Behandlung von Krankheiten eingesetzt. Aufgrund ihres unterschiedlichen Wirkmechanismus teilt man Inhibitoren in unterschiedliche Klassen ein (Lehninger et al. 1994; Stryer 1991). Dabei gibt es zwei Haupttypen von Enzymhemmenden Substanzen: *irreversible* und *reversible* Inhibitoren.

Bei den irreversiblen Hemmstoffen kommt es zu einer kovalenten Bindung zwischen der Seitenkette einer Aminosäure im aktiven Zentrum des Proteins und einer funktionellen Gruppe des Inhibitors oder zu einer sehr starken nicht kovalenten Bindung, die die Dissoziation verhindern. Solchermaßen wirkende Substanzen führen zu einer Zerstörung der katalytischen Aktivität. Ein Sonderfall sind die mechanismusbasierten Inhibitoren (Krantz 1992). Hier erfolgt die kovalente Bindung erst nach Umsetzung der eingesetzten Substanz durch das Enzym.

Im Gegensatz dazu sind reversibel wirkende Hemmstoffe durch eine schnelle Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes gekennzeichnet. Sie werden in der Regel nur über schwache intermolekulare Wechselwirkungen, wie Van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen, Salz- oder Wasserstoffbrücken gebunden.

Kompetitive, reversible Hemmung



Nicht-kompetitive, reversible Hemmung

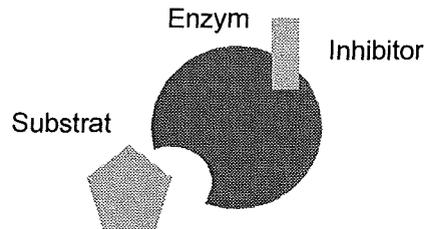


Abbildung 1-1 Schema der kompetitiven und nicht-kompetitiven reversiblen Hemmung.

Bei dieser Klasse unterscheidet man weiter zwischen *kompetitiven* und *nicht-kompetitiven* Inhibitoren (siehe Abbildung 1-1). Eine kompetitiv wirkende Substanz konkurriert mit dem Substrat um die Besetzung des aktiven Zentrums. Ein Charakteristikum der kompetitiven Hemmung ist daher die Möglichkeit der Reduktion des Hemmgrades durch die Erhöhung der Substratkonzentration. Bei der nicht-kompetitiven Hemmung wird durch die Bindung, die nicht im aktiven Zentrum erfolgt, eine Konformationsänderung des Proteins induziert und dadurch die Aktivität reduziert. Reversibel und kompetitiv wirkende Hemmstoffe ahmen entweder die Struktur des Substrats oder des Übergangszustands zwischen Substrat und Produkt nach und haben daher eine hohe Affinität zur Bindungsstelle. Sie können aber nicht umgesetzt werden.

Sowohl bei der Bindung des Substrats als auch bei der Bindung eines Inhibitors kommt es zu Konformationsänderungen des Proteins und eventuell des Substrates, durch die die Strukturen der beiden wechselwirkenden Substanzen aneinander angepaßt werden. Diesen Mechanismus bezeichnet man als induzierte Anpassung (*induced-fit*). Dabei übt das Enzym Kräfte auf das gebundene Molekül aus, die dazu dienen, das Substrat in den Übergangszustand zu bringen.



$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Gleichung 1-1 Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes K_i . $[E], [I]$: Konzentration des freien Enzyms bzw. Inhibitors; $[EI]$: Konzentration des Enzym-Inhibitor-Komplexes. Die Einheit der Dissoziationskonstante ist mol^{-1} .

Als Maß für die Aktivität des Hemmstoffes wird meistens die Dissoziationskonstante K_i des Komplexes (siehe Gleichung 1-1) angegeben, d. h. je kleiner dieser Wert, desto kleiner die Konzentration an freiem Protein und desto stärker die Hemmung. Die Dissoziationskonstante K_i entspricht der Konzentration an freiem Inhibitor bei 50% Hemmung.

Um Informationen über Protein-Ligand-Wechselwirkungen zu gewinnen, sind vor allem die Fragen nach der Art, dem Ort, der Stärke und dem molekularen Mechanismus der Bindung von Interesse.

1.2 Methoden zur Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Nachdem nun ihre Bedeutung bekannt ist, sollen die bisher zur Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen eingesetzten Methoden erläutert werden. Zu den klassischen Verfahren zählen z. B. die Messung der enzymatischen Aktivität mit und ohne Inhibitor oder Verdrängungsreaktionen von einem mit einem Fluoreszenz- oder Absorptionsfarbstoff markierten Inhibitor oder Substrat. Sie liefern Informationen über Vorliegen und Stärke, jedoch nicht über den molekularen Mechanismus der Bindung. Wegen der geringen apparativen Voraussetzungen und der Vielseitigkeit werden diese Verfahren nach wie vor hauptsächlich verwendet. Allerdings erfordert jedes Protein ein eigenes zu entwickelndes Testverfahren, da für jedes Protein erst eine Möglichkeit gefunden werden muß, die Hemmung seiner Aktivität oder die Verdrängung eines bekannten Inhibitors zu messen.

Als Ersatz für die klassischen Verfahren sind massensensitive, biosensorische Methoden, die auf Oberflächen-Plasmon-Resonanz, Gitterkopplung und Oberflächenwellen beruhen, im Einsatz. Diese Methoden haben den Vorteil, ohne Markierung und Konkurrenzreaktionen auszukommen, und liefern die Möglichkeit, die Bindereaktion in Echtzeit beobachten zu können. Allerdings ist eine Immobilisierung oder Fixierung des Proteins auf der Oberfläche nötig. Diese kann die Struktur und Eigenschaften des Proteins beeinflussen und zur völligen Inaktivierung führen. Diese Methoden liefern wie die klassischen keine Informationen über den molekularen Mechanismus und den Ort der Bindung.

Die modernen, spektroskopischen und computergestützten Verfahren, wie z. B. NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie, sind in der Lage, Ort, Art und den molekularen Mechanismus der Bindung genau zu bestimmen. Von diesen Methoden wird die Röntgenkristallographie am häufigsten zur Strukturbestimmung verwendet. Dazu ist es notwendig, von dem zu untersuchenden Protein bzw. Komplex Kristalle ausreichender Qualität und Größe zu züchten. Dies ist bisher nur für eine kleine Zahl der bekannten Proteine gelungen. Die Übertragbarkeit der Kristallstruktur auf die Struktur im gelösten Zustand ist allerdings nicht gesichert. Der Aufwand für eine Strukturermittlung ist zudem sehr hoch, so daß nur eine geringe Zahl unterschiedlicher Komplexe eines Proteins untersucht werden kann. Obwohl von

ca. 200 000 Proteinen die Sequenz in der Swiss-Prot Datenbank zu finden ist (SWISS-PROT 1999), sind zur Zeit nur 9691 Proteinstrukturen bekannt (Brookhaven Protein Data Base 1999). Davon wurden 80% mittels Röntgenstrukturanalyse in Kombination mit Modelling-Verfahren bestimmt.

Das rationale Drug Design (Sun u. Cohen 1993) setzt auf Computersimulation und versucht die Wechselwirkungen zwischen einem Protein und verschiedenen Liganden zu analysieren. Ausgehend von der Struktur des Proteins wird der zu untersuchende Ligand mittels speziell entwickelter Algorithmen in das aktive Zentrum eingepaßt. Als Ausgangspunkt für die Simulation müssen jedoch die Sekundär-, Tertiär- und die Quartärstruktur des Proteins aus Röntgen-, NMR-Untersuchungen oder durch Sequenzvergleich bekannt sein, so daß die oben genannte Einschränkung auf bekannte Strukturen hier ebenfalls gilt.

Fesik et al. (Shuker et al. 1996; Kessler 1997) haben ein Verfahren entwickelt, das NMR-Untersuchungen von vielen Komplexen erlaubt. Nach der kompletten NMR-Strukturbestimmung des Proteins werden nur noch die 2D- $^{15}\text{N}^1\text{H}$ -Resonanzen der Komplexe betrachtet. Treten in diesem Bereich Verschiebungen auf, so sind die entsprechenden Aminosäuren an der Komplexbildung beteiligt. Die NMR-Spektroskopie ist allerdings auf Proteine mit einem Molekulargewicht von unter 30 kDa beschränkt, so daß auch dieses Verfahren nur für einen kleinen Teil der bekannten Proteine einsetzbar ist.

Die FTIR-Spektroskopie hat den Vorteil, im Gegensatz zu den oben beschriebenen Verfahren auf beliebige Proteine anwendbar zu sein. Sie kann jedoch nur in begrenztem Umfang strukturelle Aussagen liefern. Aus dem Absorptionsspektrum eines Proteins lassen sich durch Zerlegung der Amid-I-Bande die Anteile unterschiedlicher Sekundärstrukturmerkmale an der Gesamtstruktur abschätzen. Durch Vergleich der Spektren von Protein und Komplex können so Veränderungen der Sekundärstruktur durch die Komplexbildung ermittelt werden (Buono et al. 1994). Da durch die Bindung eines Liganden meist nur kleine Änderungen der Sekundärstruktur ausgelöst werden, ist diese Abschätzung meist zu grob, um die Unterschiede zu erkennen.

Erfaßt man dagegen nur die spektralen Unterschiede zwischen zwei Zuständen des Proteins, dann erhält man ein detaillierteres Bild der Vorgänge in dem Protein. So ist es sogar möglich, die auftretenden Signale einzelnen Aminosäuren zuzuordnen. Die Differenzbanden sind im Vergleich zur Gesamtabsorption des Proteins verschwindend klein, so daß der Übergang von einem Zustand zum anderen nur durch kleinste Störungen des Systems ausgelöst werden darf. Um die Störungen durch das Triggern der Reaktion zu minimieren, war die Zugabe eines Reagenzes daher bisher nur als maskierte Substanz möglich (Barth et al. 1991). Diese Moleküle besitzen eine zusätzliche Gruppe, die die Bindung der Substanz an das Protein oder ihre Umsetzung verhindert. Diese Gruppe ist über eine photolabile Bindung mit dem aktiven Teil verknüpft. Durch Bestrahlung mit einem Laser wird das aktive Molekül freigesetzt. Der

Nachteil dieser Maskierung besteht darin, daß jedes dieser Moleküle erst aufwendig synthetisiert werden muß. Daher kann dieses Verfahren nur mit hohem Synthesaufwand zur Untersuchung beliebiger Komplexe eingesetzt werden. Außerdem entstehen durch die Abspaltung des Maskierungsteils ebenfalls Banden im Differenzspektrum, die sich mit den Banden der Komplexbildung überlagern. Das Spektrum der durch den Laser induzierten Spaltung muß daher separat bestimmt und bei der Interpretation des Differenzspektrums berücksichtigt werden.

1.3 Aufgabenstellung

Wie aus der Beschreibung der verwendeten Verfahren ersichtlich ist, gibt es derzeit kein Verfahren, mit dem die Wechselwirkung zwischen einem beliebigen Protein und unterschiedlichen Liganden untersucht werden kann, ohne daß entweder die Struktur des Proteins vollständig bestimmt werden muß oder ein eigenes Testsystem entwickelt wird. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Möglichkeiten und Grenzen einer Methode zur FTIR-differenzspektroskopischen Untersuchung beliebiger Protein-Ligand-Wechselwirkungen zu untersuchen.

Der Vorteil des Einsatzes der FTIR-Spektroskopie ist, daß im Gegensatz zur Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektroskopie im UV/VIS-Bereich keine Markierung der eingesetzten Substanzen nötig ist. Praktisch jede chemische Bindung besitzt eine charakteristische IR-Absorption, die von der chemischen Umgebung, d. h. von den direkt gebundenen Nachbarn aber auch von Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, Van-der-Waalskräften und hydrophoben Kontakten abhängig ist. Eine Komplexbildung zwischen einem Protein und einem Liganden führt zum Lösen von intramolekularen Wechselwirkungen und zur Ausbildung neuer intermolekularer Kontakte. Dadurch ändert sich die chemische Umgebung einiger Atome bzw. einiger chemischen Bindungen des Liganden und des Proteins, es kommt zu einer Verschiebung der entsprechenden Absorptionen. Ein FTIR-spektroskopisches Verfahren muß diese Änderungen mit ausreichender Präzision erfassen können.

Mittels des entwickelten Verfahrens soll es möglich sein, Wechselwirkungen zwischen einem Protein und beliebigen chemischen Substanzen zu erfassen. Die Verwendung von maskierten Substanzen ist nicht möglich, da damit eine Einschränkung der einsetzbaren chemischen Substanzen verbunden wäre.

Im ersten Teil dieser Arbeit soll untersucht werden, ob mit Hilfe der FTIR-Differenzspektroskopie eine Unterscheidung zwischen bindenden und nicht-bindenden Substanzen möglich ist. Die Differenzspektren sollen dabei über die Methode der statischen Differenzbildung, d. h. durch den Vergleich zweier getrennter Lösungen von Komplex und Protein aufgenommen werden. Bisher gibt es in der Literatur keinen Beweis für die Erkennbarkeit kleiner Konformationsänderungen aus zwei Lösungen, meist wird diese Möglichkeit sogar

angezweifelt (Mäntele 1993). Daher sollen in dieser Arbeit die Voraussetzungen untersucht werden, unter denen dieser Vergleich möglich ist.

Diese Untersuchungen sollen an dem Modellsystem Trypsin durchgeführt werden. Die Spektren werden so weit wie möglich interpretiert, um zu zeigen, daß aufgrund der Lage der Banden auch Aussagen über die Art, den Ort und den molekularen Mechanismus der chemischen Bindung möglich sind.

Um die verschiedenen Lösungen in die Meßzelle transportieren zu können, ist ein Flußsystem nötig, das die Aufnahme der Spektren unter praktisch identischen Bedingungen ermöglicht. Ein solches Flußsystem sollte in dieser Arbeit entwickelt und charakterisiert werden. Randbedingungen des Verfahrens sind die hohe Hintergrundabsorption, die die optische Weglänge und damit die Schichtdicke, die durchdrungen werden kann, auf maximal 10-12 μm begrenzt, und die teilweise hohe Viskosität wäßriger Proteinlösungen. Die Probleme, die sich aus dem resultierenden großen Druckabfall im Flußsystem und der hohen mechanischen Beanspruchung aller verwendeten Komponenten ergeben, sind zu lösen.

Da das Arzneimittelscreening ein wichtiges Einsatzgebiet für Untersuchungsverfahren von Protein-Ligand-Wechselwirkungen ist, sollen im zweiten Teil dieser Arbeit Möglichkeiten untersucht werden, das entwickelte Verfahren zu automatisieren.

Bevor nun auf die Realisierung des Verfahrens eingegangen wird, werden zuerst die physikalischen Grundlagen der FTIR-Spektroskopie und der hydraulischen Vorgänge erläutert.

2 Spektroskopie

2.1 UV/VIS-Spektroskopie

Im Bereich von etwa 190-900 nm lassen sich mittels der UV/VIS-Spektroskopie in Molekülen Übergänge zwischen verschiedenen elektronischen Zuständen verfolgen. Dabei wird durch die Absorption eines Lichtquants ein Elektron aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand gebracht. Der Anregungsprozeß kann entweder von einem π -Orbital ($\pi \rightarrow \pi^*$) oder von einem freien Elektronenpaar ($n \rightarrow \pi^*$) ausgehen. Der Zusammenhang zwischen der absorbierten Wellenlänge und der Energiedifferenz zwischen den beiden elektronischen Zuständen ist in Gleichung 2-1 beschrieben.

$$E = h \cdot c \cdot \frac{1}{\lambda} = h \cdot c \cdot \tilde{\nu}$$

Gleichung 2-1 h : Planck'sches Wirkungsquantum, c : Lichtgeschwindigkeit, λ : Wellenlänge, $\tilde{\nu}$: Wellenzahl.

Die Abhängigkeit der Absorption (Extinktion) bei einer bestimmten Wellenlänge von der Schichtdicke und der Konzentration des absorbierenden Stoffes wird durch das Lambert-Beer-Gesetz (siehe Gleichung 2-2) beschrieben.

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

Gleichung 2-2 Lambert-Beer-Gesetz. A : Absorption, I_0 : Ausgangsintensität des Strahls, I : Intensität des Strahls nach Passage durch die Probe, ϵ_{λ} : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ , c : Konzentration, d : Schichtdicke.

2.2 FTIR-Spektroskopie

In der Infrarotspektroskopie wird die Absorption von Strahlung im Wellenlängenbereich 800-50000 nm untersucht. Dabei unterscheidet man zwischen dem nahen (800-2500 nm), dem mittleren (2500-40000 nm) und dem fernen IR-Bereich (40000-50000 nm). Üblicherweise wird bei der FTIR-Spektroskopie nicht die Wellenlänge, sondern die Wellenzahl (siehe Gleichung 2-3) als Einheit verwendet. Durch Absorption infraroter Strahlung werden Übergänge zwischen den Schwingungs- und Rotationsniveaus in einem Molekül angeregt. Eine Schwingung ist infrarotaktiv, wenn sich das Dipolmoment des Moleküls während der Schwingung periodisch ändert.

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} \text{ in } [\text{cm}^{-1}]$$

Gleichung 2-3 Definition der in der FTIR-Spektroskopie als Einheit verwendeten Wellenzahl.

Prinzipiell gibt es zwei Verfahren zur Aufnahme von IR-Spektren. Konventionell werden IR-Spektren mittels eines dispersiven Verfahrens aufgenommen, bei dem mittels eines Monochromators der gesamte Wellenlängenbereich schrittweise durchlaufen wird und die zugehörige Intensität detektiert wird.

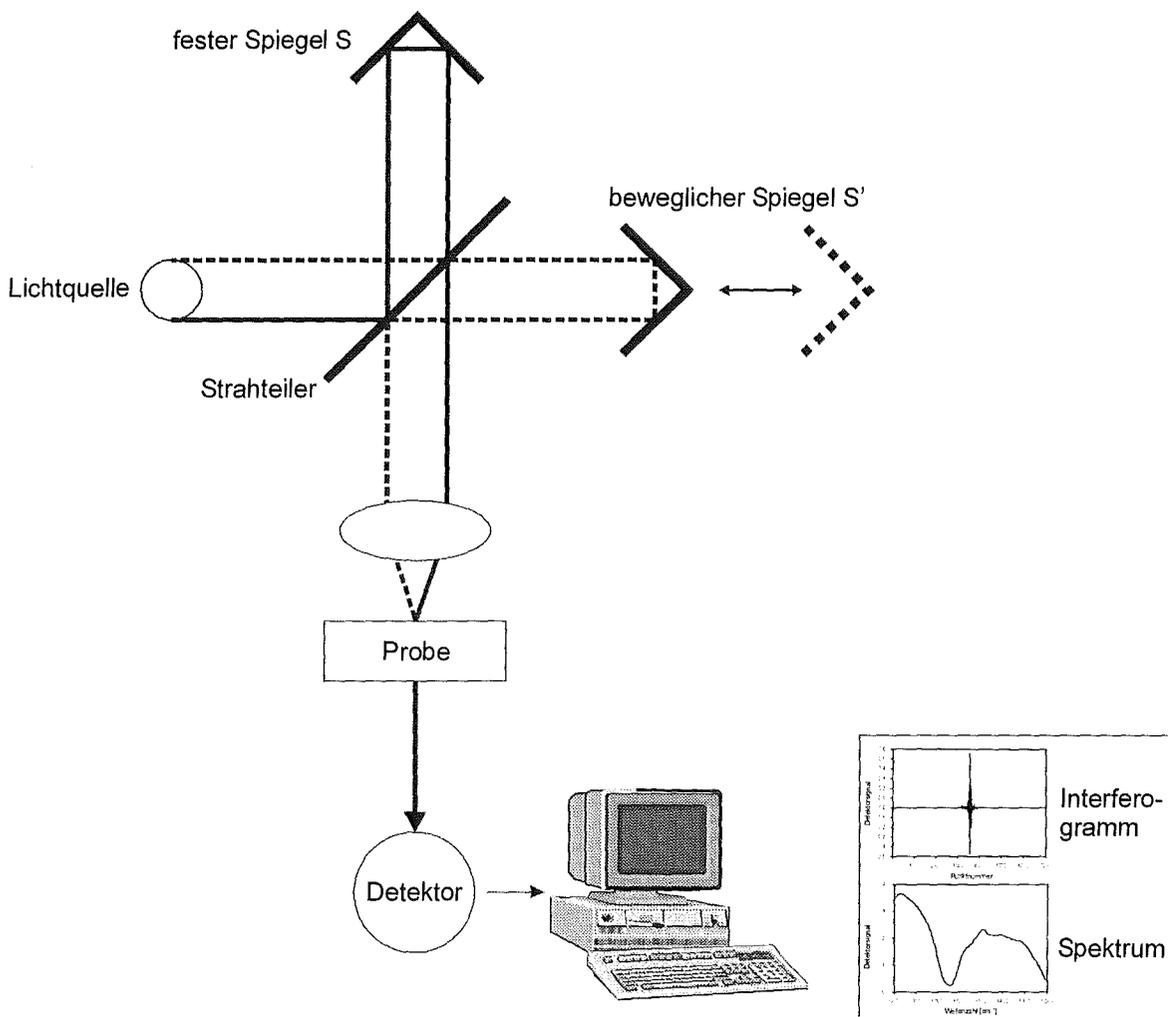


Abbildung 2-1 Schematische Darstellung eines FTIR-Spektrometers.

Das Fourier-Transform-Verfahren (Knöziger 1976) ist dagegen ein kontinuierliches Verfahren, beim dem alle Wellenlängen gleichzeitig detektiert werden. Kernstück der Aufnahmetechnik ist das Michelson Interferometer, das in Abbildung 2-1 dargestellt ist.

Der polychromatische Strahl der Lichtquelle wird mit Hilfe eines Strahlteilers in zwei Teilstrahlen mit etwa gleicher Intensität aufgeteilt. Der eine Teilstrahl legt eine definierte Strecke

über einen festen Spiegel S zurück. Der zweite Teilstrahl läuft über einen beweglichen Spiegel S'. Vor der Probe werden die Strahlenteile wieder zusammengeführt. Dabei kommt es zur Interferenz der beiden Teilstrahlen. Durch Superposition der Beiträge unterschiedlicher Wellenlängen ist die Intensität dieses zusammengeführten Strahls abhängig von der Position des beweglichen Spiegels.

Der Detektor mißt die Intensität der einfallenden Strahlung relativ zur Position des beweglichen Spiegels. Dazu wird die Spiegelposition ebenfalls interferometrisch mit Hilfe eines He-Ne-Lasers erfaßt. Die Intensität der einfallenden Strahlung gegenüber der Spiegelposition bezeichnet man als Interferogramm. Ist der Weg der beiden Strahlen exakt gleich, so kommt es für alle Wellenlängen zu einer positiven Interferenz, das Signal ist maximal. Aus dem so gemessenen Interferogramm läßt sich das Spektrum der Probe mit Hilfe einer mathematischen Umwandlung, der Fourier-Transformation, berechnen.

Die FT-Methode weist gegenüber dem dispersiven Verfahren drei wesentliche Vorteile auf:

- **Multiplex-Vorteil:**

Alle Frequenzen des eingestrahlten Lichtes können simultan detektiert werden. Dies führt zu einem großen Zeitvorteil. Dadurch kann bei gleicher Meßzeit über mehrere Spektren gemittelt werden und so das Signal/Rausch-Verhältnis deutlich verbessert werden.

- **Jaquinot-Vorteil:**

Bei dispersiven Geräten wird die spektrale Auflösung und die Intensität der Strahlung durch den Spalt des Monochromator limitiert, d. h. eine Verbesserung der Auflösung wird mit einer Verringerung der Intensität erkaufte. Bei FTIR-Geräten muß dieser Kompromiß zwischen Intensität und Auflösung nicht eingegangen werden. Die Auflösung ist nur von der Länge der Strecke abhängig, die der bewegliche Spiegel S' zurücklegt. An Stelle des Spalts werden kreisförmige Aperturblenden eingesetzt, die einen wesentlich höheren Lichtdurchsatz haben.

- **Connes-Vorteil:**

Mit Hilfe des He-Ne-Lasers läßt sich die Position des beweglichen Spiegels S' sehr exakt bestimmen. Somit wird eine sehr große Wellenlängenpräzision von ca. $0.1-0.3 \text{ cm}^{-1}$ erreicht.

2.3 Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie

Aufgrund der Vorteile des FT-Verfahrens ist es möglich, Messungen in sehr kurzer Zeit durchzuführen und neben den spektralen auch kinetische Informationen zu erhalten. Die unterschiedlichen Verfahren zur zeitaufgelösten FTIR-Messung (Mäntele 1996; Siebert 1996) sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

2.3.1 Rapid Scan Methode

Im Rahmen dieser Arbeit wird die *Rapid Scan* Methode (Braiman M. S. et al. 1987) (siehe Abbildung 2-2) eingesetzt. Dabei wird die kurze Aufnahmezeit durch eine möglichst schnelle Bewegung des Spiegels im Interferometer ermöglicht. Daten lassen sich sowohl bei der Vorwärts- als auch bei der Rückwärtsbewegung des Spiegels aufnehmen. Mit geringer werdender spektraler Auflösung verkürzt sich der Spiegelweg und gleichzeitig verringert sich die Zeit zur Spektrenaufnahme. Da für die Fourier-Transformation aufgrund der Symmetrieeigenschaften bei einem idealen Interferometer nur das halbe Interferogramm benötigt wird, können pro Spiegelzyklus jeweils zwei Interferogramme beim Vorwärts- und beim Rückwärtslauf gemessen werden, insgesamt also 4 pro Zyklus. Die Zeitauflösung ist limitiert durch mechanische Faktoren, wie die Masse und die Dynamik des Spiegels, und die Digitalisierungsrate der Datenaufnahme. Bei dem in dieser Arbeit für Messungen im Rapid Scan Modus verwendeten Spektrometer (EQUINOX 55 der Firma Bruker) liegt die minimale Zeit pro Spektrum bei 25 ms. Sie wird bei einer Auflösung von 8 cm^{-1} und einer Spiegelfrequenz von 160 Hz erreicht.

Das *Rapid Scan* Verfahren wird hauptsächlich für Reaktionen eingesetzt, die im Millisekunden- bis Sekundenbereich ablaufen, die nicht zyklisch sind oder deren Rückreaktion langsam abläuft.

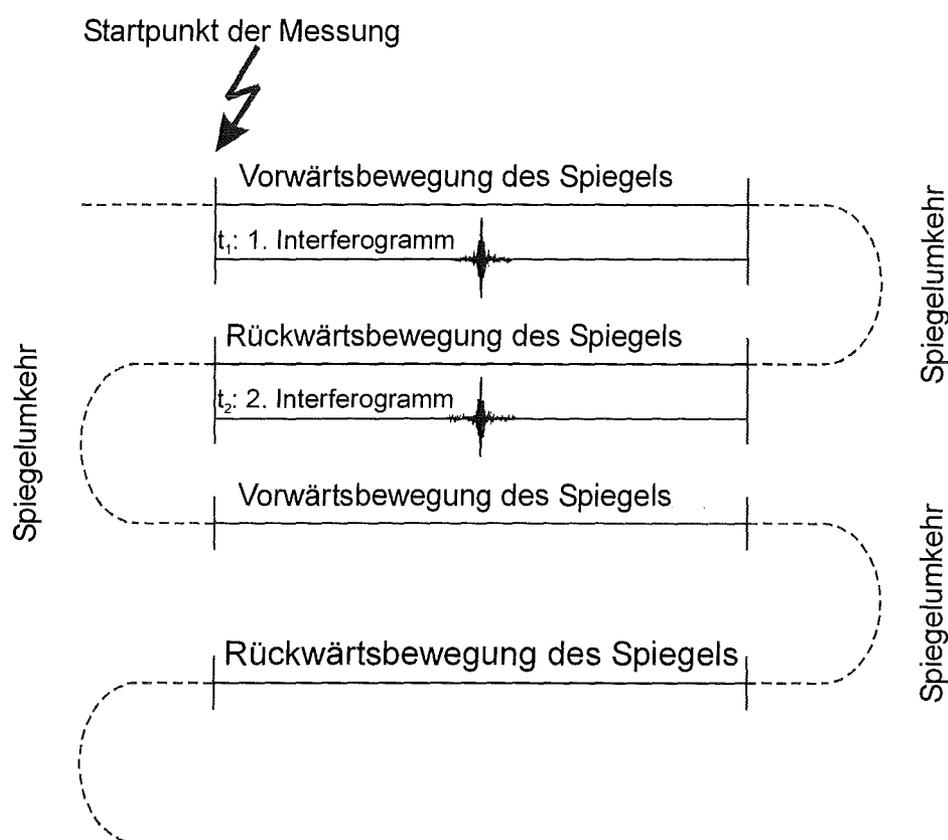


Abbildung 2-2 Schematische Darstellung der Rapid Scan Methode.

Neben der *Rapid Scan* Methode gibt es noch zwei weitere Verfahren, die im Folgenden kurz beschrieben werden. Sie wurden im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht verwendet, da sie die Möglichkeit zur beliebigen Wiederholung der Experimente, d. h. eine schnelle und reversible Reaktion, voraussetzen.

2.3.2 Stroboskopmethode

Bei der Stroboskopmethode (Mantz 1976) (Schema siehe Abbildung 2-3) erfolgt die Datenaufnahme während der Vorwärtsbewegung des Spiegels. Dabei wird der Startpunkt der Reaktion mit jedem Spiegeldurchlauf weiter nach hinten verschoben. Nachdem die Reaktion für jeden Datenpunkt während der Spiegelbewegung durchlaufen wurde, werden die gemessenen Werte umsortiert und die zeitaufgelösten Spektren berechnet. Die Zeitauflösung dieser Methode liegt im Bereich von Mikrosekunden. Nachteilig bei dieser Methode ist, daß der Multiplex-Vorteil zumindest teilweise verloren geht, da eine mehrfache Aufnahme von Datenpunkten nicht verhindert werden kann. In der Regel sind zwischen 10000 und 100000 Wiederholungen nötig, um eine vollständige Kinetik aufzunehmen.

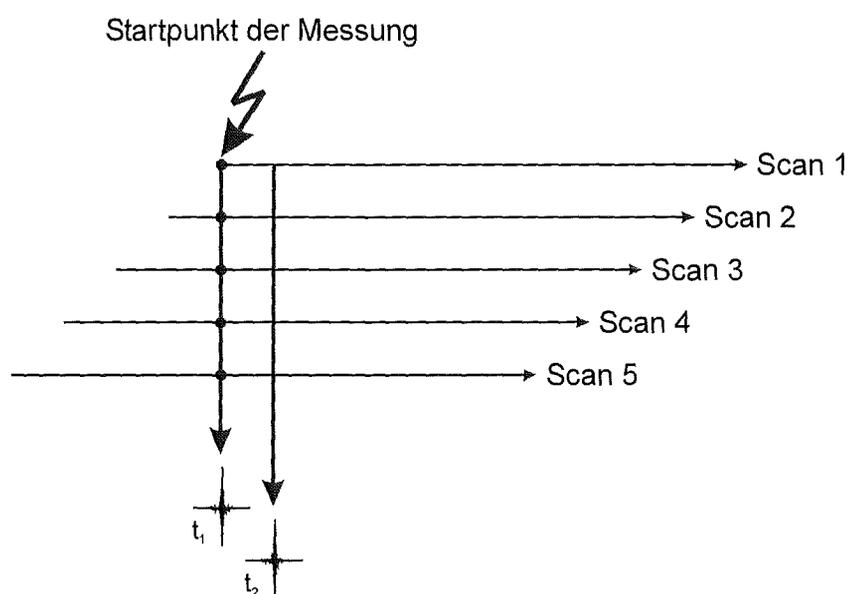


Abbildung 2-3 Schematische Darstellung der Stroboskopmethode nach (Souvignier u. Gerwert 1992).

2.3.3 Step Scan Methode

Das schnellste Verfahren zur zeitaufgelösten FTIR-Messung ist die *Step Scan* Technik (Uhmann et al. 1991) (Schema siehe Abbildung 2-4). Der bewegliche Spiegel S' wird dabei während der Reaktion auf einer festen Position gehalten. Die Aufnahme der Datenpunkte erfolgt bei jeder Wiederholung der Reaktion nur für eine Spiegelposition. Nachdem die gesamte Reaktion für jede einzelne Spiegelposition aufgenommen wurde, lassen sich die

Interferogramme berechnen. Die Zeitauflösung liegt in der Regel im Nanosekundenbereich. Im Gegensatz zur Stroboskopmethode werden dabei keine Datenpunkte mehrfach aufgenommen.

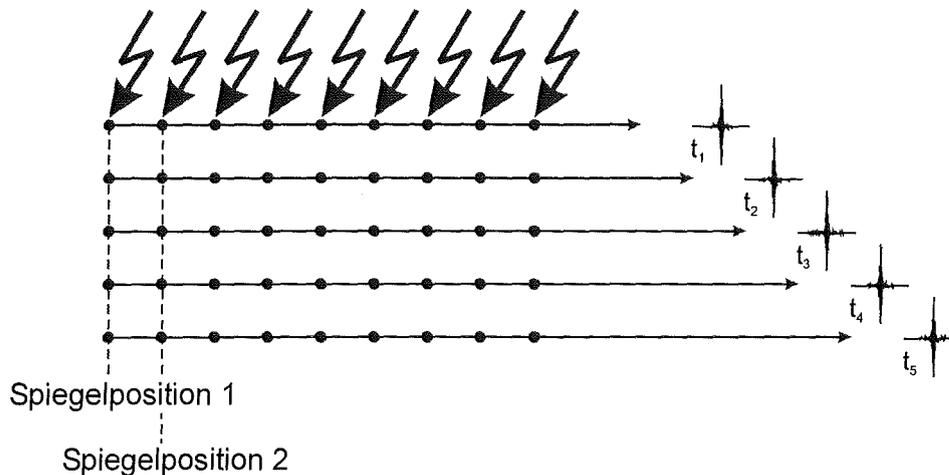


Abbildung 2-4 Schematische Darstellung der Step Scan Methode.

2.3.4 Kinetik bei einzelnen Wellenlängen

Die kinetische Untersuchung einzelner Wellenlängen stellt eine Alternative zur Stroboskop- und Step Scan Methode dar, wenn keine zyklische Wiederholung der Reaktion möglich ist. Sie ist vor allem durch die Einführung durchstimmbarer Infrarotlaser wieder attraktiv geworden. Die erreichbare Zeitauflösung liegt im Nanosekundenbereich. Auf diese Weise ist vor allem bei bekannten spektralen Änderungen die Untersuchung der Kinetik einiger weniger Wellenlängen möglich.

2.4 Infrarotspektroskopie an Proteinen

Aufgrund der Komplexität der Systeme stellt die Infrarotspektroskopie an Proteinen besondere Anforderungen an die Probenpräparation, die Messung und die Auswertung der Meßdaten.

2.4.1 Messungen in wäßrigen Lösungen

Da die Messungen möglichst unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden sollen, liegen die Proteine meist in gepufferter, wäßriger Lösung vor. Die Absorptionen der Proteine, die wichtige Informationen über die Struktur und die Funktionsweise eines Proteins liefern, liegen in der Regel zwischen $1800-1200\text{ cm}^{-1}$. Darunter fallen Schwingungen des Peptidrückgrats, der Aminosäureseitenketten und der Kofaktoren. Dieser Bereich überlappt jedoch mit einer starken Absorptionsbande des Wassers (H_2O) bei 1643.5 cm^{-1} (δ O-H-Schwingung). Diese starke Absorption des Wassers wird durch die hohe Konzentration von Wasser

(55 mol/l) und nicht durch den molaren Extinktionskoeffizienten ($21.8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) verursacht (Venyaminov u. Prendergast 1997). Schon eine Schichtdicke von $10 \mu\text{m}$ führt zu einer Absorption von 1. Mit Schichtdicken größer $15 \mu\text{m}$ kann daher nicht gearbeitet werden. Um trotzdem ausreichende Signalhöhen zu erreichen, muß mit hohen Proteinkonzentrationen (im Bereich zwischen 0.1 und einigen Millimolar) gearbeitet werden. Dies kann, abhängig von dem verwendeten Protein, zu Lösungen hoher Viskosität führen.

Die ideale Schichtdicke für infrarotspektroskopische Untersuchungen in wäßrigen Proteinlösungen liegt sogar noch deutlich unter $10 \mu\text{m}$. Untersuchungen des Zusammenhangs zwischen Signal/Rausch-Verhältnis und Schichtdicke ergaben bei Verwendung von 3.5 mM Lysozymlösung im Bereich der Wasserbande bei 1643.5 cm^{-1} eine optimale optische Weglänge von $3.6 \mu\text{m}$ (Venyaminov u. Prendergast 1997). Bei größerer Schichtdicke steigt die Amplitude des Rauschens an, bei kleinerer nimmt die Signalhöhe ab. Im Bereich der Amid II Bande bei 1550 cm^{-1} ist die optimale Schichtdicke aufgrund der geringeren Absorption mit $12 \mu\text{m}$ deutlich größer.

Ein Ausweg liegt in der Verwendung von D_2O anstelle von H_2O . Durch Isotopenaustausch verschiebt sich die Wasserabsorption von 1645 cm^{-1} nach 1215 cm^{-1} (δ O-D-Schwingung). Es entsteht ein spektroskopisches Fenster oberhalb von 1300 cm^{-1} . Daher können Schichtdicken bis zu $100 \mu\text{m}$ verwendet werden. Durch den Isotopenaustausch kann es aber auch zu Änderungen der Eigenschaften und der Funktion eines Proteins kommen, da z. B. die Tendenz zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen modifiziert ist. Auch wenn solche Artefakte nicht entstehen, sind kleine Schichtdicken vorteilhaft, um einen H/D-Vergleich zu ermöglichen (siehe unten).

2.4.2 Bandenzuordnung bei Proteinen

Die Zuordnung der Banden in den komplexen Proteinspektren ist meist schwierig. Durch die Vielzahl an Einzelabsorptionen kommt es zu starken Überlappungen und zur Bildung breiter Banden. Als Hilfsmittel zur Zuordnung werden H/D-Austausch (Verschiebung der Schwingungsbanden in Abhängigkeit von der Anzahl gebundener Wasserstoffatome) oder Studien an Mutanten verwendet.

Peptidrückgrat

Die Hauptabsorptionen der Proteine im Bereich zwischen $1800\text{-}1200 \text{ cm}^{-1}$ erfolgen durch das Peptidrückgrat. Die größte Bande ist die Amid I Bande. Bei dieser Schwingungsmode ist die potentielle Energie zu maximal 80% in der CO-Streckschwingung, zu maximal 20% in der CN-Streckschwingung sowie in der CCN-Deformationschwingung lokalisiert. Sie zeigt eine starke Abhängigkeit von der Sekundärstruktur des Proteins und eine geringe Verschiebung durch H/D-Austausch von maximal 10 cm^{-1} . Die in der Literatur gefundenen Amid I

Absorptionsbereiche für die verschiedenen Sekundärstrukturmerkmale sind in Tabelle 2-1 dargestellt.

Sekundärstruktur	H ₂ O [cm ⁻¹]	D ₂ O [cm ⁻¹]
α-Helix	1655-1645	1655-1643
	1640-1630*	1640-1630*
β-Faltblatt	1698-1688	1686-1647
	1676-1669	1640-1630
	1645-1625	
β-Schleifen	1688-1667	1693-1664
	ungeordnet	1660-1648

Tabelle 2-1 Zusammenhang zwischen der Amid I Bande und den unterschiedlichen Sekundärstrukturmerkmalen. Die mit * gekennzeichneten Bereiche treten nur bei langen α-Helices mit geringem Extinktionskoeffizienten auf (Arrondo et al. 1993; Baymann 1995)

Die Amid II Bande im Bereich von 1575-1480 cm⁻¹ ist ebenfalls eine Kombinationsschwingung. Hier ist die Energie zu ca. 60% in der NH-Biegeschwingung und zu 40% in der CN-Streckschwingung lokalisiert, kleine Anteile entfallen auf die CO-Biege-, CC-Streck- und NC-Streckschwingungen (Arrondo et al. 1993). Die Sekundärstruktur hat auf die Lage der Amid II Bande wenig Einfluß. Allerdings bewirkt ein H/D-Austausch durch Aufhebung der Kopplung zwischen der NH- und der CN-Schwingung eine starke Verschiebung in den Bereich zwischen 1490-1460 cm⁻¹. Die entkoppelte ND-Schwingung absorbiert unterhalb von 1100 cm⁻¹.

Aminosäureseitenketten

Die Absorptionen der Aminosäureseitenketten sind über den gesamten untersuchten Bereich verteilt. Neben den CC, CO, C=O, COO⁻, CN-Streckschwingungen (ν) werden auch Deformationsschwingungen (δ) von Wasserstoffbindungen und Ringschwingungen erfaßt.

Aufgrund des großen Einflusses der Umgebung einer Gruppe, z. B. des Wasserstoffbrückensystems, auf die Absorptionseigenschaften ist die Vorhersage der genauen Lage der Seitenkettensignale manchmal sehr schwierig. Die ungefähre Lage läßt sich durch Messungen an Modellsystemen und freien Aminosäuren bestimmen. Eine Zusammenfassung der Literaturwerte für die stärksten Seitenkettenabsorptionen ist in Tabelle 2-2 zu finden. Neben der Lage der Banden $\tilde{\nu}$ ist auch die Halbwertsbreite $\tilde{\nu}_{1/2}$ und der Extinktionskoeffizient angegeben. Deutliche Abweichungen der tatsächlichen Absorptionen von den Literaturwerten sind jedoch möglich.

Aminosäure	Schwingung	H ₂ O		D ₂ O	
		$\tilde{\nu}(\nu_{1/2})$ [cm ⁻¹]	ϵ [l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	$\tilde{\nu}(\nu_{1/2})$ [cm ⁻¹]	ϵ [l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]
Asp	$\nu(\text{C=O})$	1721 (44)	292	1712 (44)	246
	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$	1578 (53)	169	1584 (31)	668
	$\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$	1402	256	1405	
	$\nu(\text{COH})$	1450-1264		1058-955	
Glu	$\nu(\text{C=O})$	1716 (52)	314	1706 (51)	282
	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$	1556 (35)	194	1567 (33)	737
	$\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$	1404	316	1407	
	$\nu(\text{COH})$	1450-1264		1058-955	
Arg	$\nu_{\text{as}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$	1673	420	1608-1595	460
	$\nu_{\text{sym}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$	1633	300	1586-1577	500
Lys	$\delta_{\text{as}}(\text{NH}_3^+)$	1636 (43)	115	1201	
	$\delta_{\text{sym}}(\text{NH}_3)$	1529 (41)	79	1170	
Asn	$\nu(\text{C=O})$	1680 (27)	274		
	$\delta(\text{NH}_2)$	1623 (34)	101		
Gln	$\nu(\text{C=O})$	1671 (31)	285		
	$\delta(\text{NH}_2)$	1610 (32)	75		
	$\nu(\text{CN})$	1410		1409	
Tyr-OH	$\nu(\text{CC})$	1621-1615	150	1618-1612	160
	$\nu(\text{CC})$	1602-1594	100		
		1541	100	1541	100
	$\nu(\text{CC})+\delta(\text{CH})$	1518-1516	430	1516-1513	500
	$\nu(\text{C-O})$	1270-1235	200	1267-1224	150
Tyr-O ⁻	$\nu(\text{CC})$	1602-1599	160	1603-1600	350
		1559	450		
	$\nu(\text{CC})+\delta(\text{CH})$	1498	700	1500	650
	$\nu(\text{C-O})$	1273-1269	580		
His	Ring	1596	70		

Aminosäure	Schwingung	H ₂ O		D ₂ O	
		$\tilde{\nu} (\tilde{\nu}_{1/2})$ [cm ⁻¹]	ϵ [l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	$\tilde{\nu} (\tilde{\nu}_{1/2})$ [cm ⁻¹]	ϵ [l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]
Trp	$\nu(\text{CN})+\delta(\text{CH})+$ $\delta(\text{NH})$	1509			
	$\nu(\text{CC})+\nu(\text{CN})+$ $\delta(\text{CH})$	1455	200		
	$\delta(\text{NH})+\nu(\text{CC})+$ $\delta(\text{CH})$	1434,1412		1382	
	$\delta(\text{NH})+\nu(\text{CN})+$ $\delta(\text{CH})$	1276			
	$\delta(\text{CH})+\nu(\text{CC})$	1245			
Pro	Ring-N	1424			
	H-Ring-N	1456			
Ser	$\delta(\text{COH})$	1420-1248		985-875	

Tabelle 2-2 Lage $\tilde{\nu}$, Halbwertsbreite $\tilde{\nu}_{1/2}$ und Extinktionskoeffizient ϵ , der Absorption der Aminosäureseitenketten in H₂O und D₂O (Barth u. Mäntele 1999; Baymann 1995; Venyaminov u. Kalnin 1990)

2.5 FTIR-Differenzspektroskopie

Bei der klassischen Differenz-Spektroskopie erhält man lösungsmittelbereinigte Spektren, indem man eine Referenzzelle, die mit dem Lösungsmittel gefüllt ist, in den Referenzstrahl eines Zweikanalspektrometers bringt. Man erhält so direkt ein Differenzspektrum, bei dem alle Absorptionen der Referenzzelle von denen der Probenzelle subtrahiert sind.

In der modernen Infrarotspektroskopie von Proteinen verwendet man hauptsächlich die reaktionsinduzierte Differenztechnik (Übersicht über verschiedene Methoden in (Mäntele 1993; Siebert 1995)). Dabei wird die Absorption eines Proteins vor, nach oder während einer Reaktion betrachtet. Mit Hilfe dieser Technik wird die Absorption des unveränderten Teils des Proteins eliminiert, und kleinste Veränderungen in der Absorption können beobachtet werden. Die so gemessenen Absorptionsänderungen betragen häufig nur ca. 1% der Gesamtabsorption oder weniger. Dazu müssen die Spektren mit einer sehr hohen Präzision aufgenommen werden. Die in Abschnitt 2.2 beschriebenen FTIR-Geräte verfügen über eine ausreichende Genauigkeit. Um störende Wasserdampfschwingungsbanden zu vermeiden, wird der Probenraum des Spektrometers während der Messung mit getrockneter Luft gespült.

Da auch durch das Triggern der Reaktion Störungen ausgelöst werden können, deren Amplitude die der erwarteten Differenzsignale deutlich übersteigt, wurden zuerst licht-

induzierte (Siebert et al. 1980; Rothschild u. Marrero 1982; Rothschild et al. 1983; Mäntele et al. 1985) und redoxinduzierte Verfahren (Moss et al. 1990; Bauscher et al. 1993) eingeführt.

Bei der reaktionsinduzierten Differenztechnik wird ein Spektrum (hier: Intensität gegen Wellenzahl) des Proteins vor und eins nach der Reaktion aufgenommen. Diese beiden Spektren werden anschließend nach Gleichung 2-4 miteinander verrechnet.

$$A(\tilde{\nu}) = \log \frac{I_{\text{nach}}(\tilde{\nu})}{I_{\text{vor}}(\tilde{\nu})} = \log \frac{I_{\text{Referenz}}(\tilde{\nu})}{I_{\text{Probe}}(\tilde{\nu})}$$

Gleichung 2-4 Berechnung der Differenzspektren. *A*: Absorption, *I*: Intensität am Detektor, $\tilde{\nu}$: Wellenzahl.

Als Beispiel für die Größe der Differenzsignale sind in Abbildung 2-5 die durch die Komplexbildung zwischen Trypsin und Benzamidin induzierten Unterschiede im Vergleich mit den Absorptionsspektren von Protein und Komplex gezeigt. Das hier entwickelte Verfahren muß solche kleinen Änderungen, die häufig nur 1% der Gesamtabsorption betragen, noch fehlerfrei erfassen können.

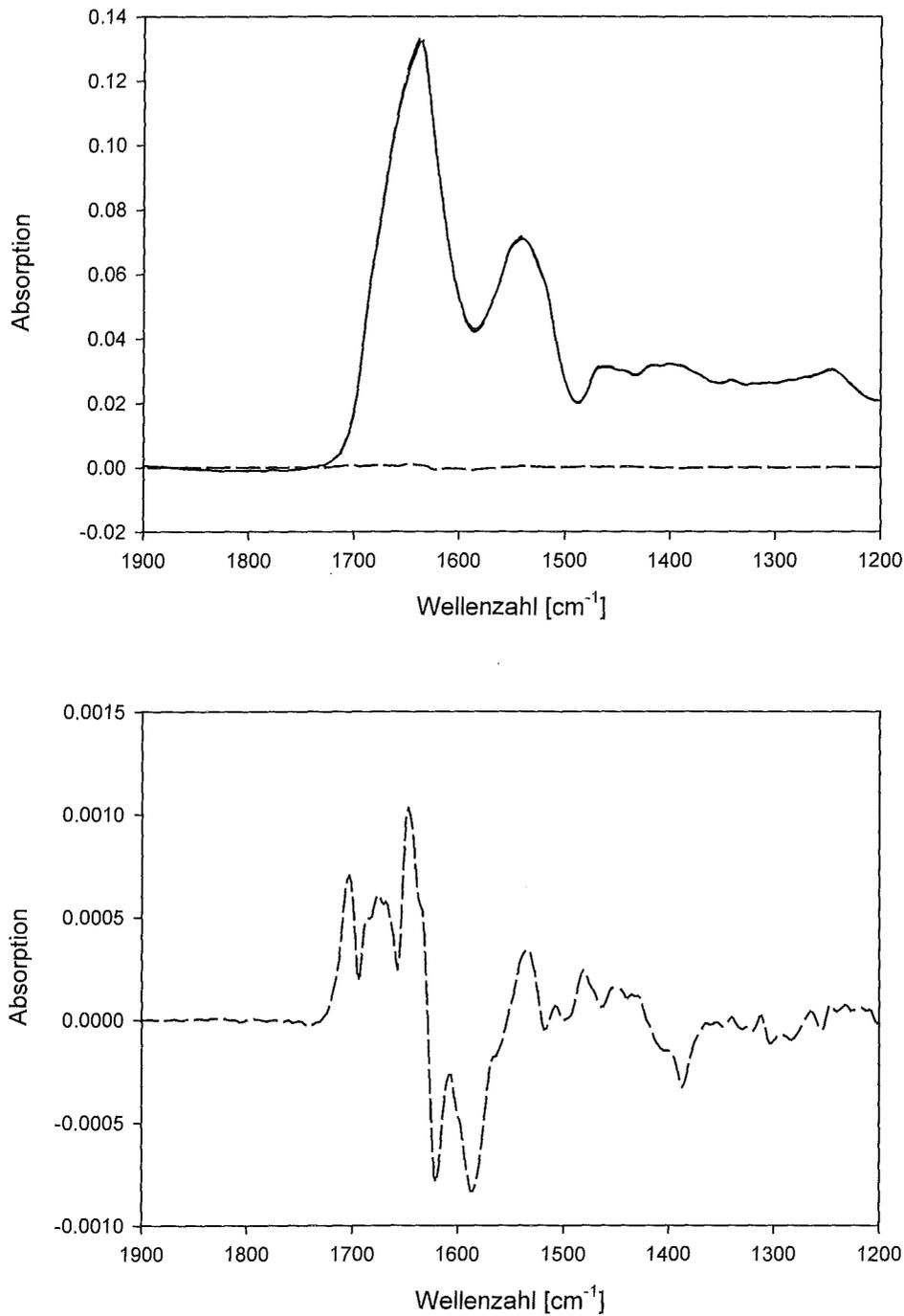


Abbildung 2-5 Das obere Bild zeigt den Vergleich der Absorptionsspektren von Trypsin (—) und dem Trypsin-Benzamidin-Komplex (- · -) mit ihrer Differenz (- -). Die Differenz ist im unteren Bild vergrößert dargestellt. Sie entspricht den Änderungen der IR-Absorption durch die Komplexbildung.

2.6 Methoden

2.6.1 UV/VIS-Spektroskopie

Für die Aufnahme der UV/VIS-Spektren wurden ein Diodenarrayspektrometer X-Dap der Firma Polytec und eine Xenon-Bogenlampe verwendet. Die Integrationszeit wurde so gewählt, daß das Signal/Rausch-Verhältnis möglichst groß ist. Der Start der Messung kann mittels eines TTL-Signals getriggert werden.

Durch Verwendung von Lichtleitern kann das Licht in den Probenraum des FTIR-Spektrometers eingekoppelt werden und synchron zur Aufnahme des IR-Spektrums gemessen werden. Der UV/VIS-Strahl läuft dabei in einem spitzen Winkel zum Infrarotstrahl, so daß der Infrarotstrahl durch die Lichtleiteroptik nicht gestört wird.

2.6.2 FTIR-Spektroskopie

Für die Messungen in wäßrigen Lösungen wurde ein EQUINOX 55 Spektrometer der Firma Bruker verwendet. Die Steuerung der Spektrenaufnahme erfolgte über einen externen PC mittels einer in unserem Arbeitskreis von Dr. David Moss entwickelten Software.

Als Detektor besitzt das Gerät neben dem standardmäßigen DTGS-Detektor einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten MCT-Detektor. Dieser wurde für alle Messungen verwendet. Der photoelektrische MCT-Detektor besitzt gegenüber dem thermischen DTGS-Detektor eine höhere Empfindlichkeit und eine geringere Ansprechzeit. Allerdings ist seine Photoleitfähigkeit nur bedingt linear proportional zur Strahlungsintensität. Dies führt zu einer Stauchung des Interferogramms in der Gegend des Maximums. In dieser Arbeit wurde daher vor der Fourier-Transformation der gemessenen Interferogramme eine Nichtlinearitätskorrektur (Keens u. Simon 1990) durchgeführt. Diese ist Bestandteil der verwendeten Software. Für die Nichtlinearitätskorrektur wurde eine Cutoff-Frequenz, d. h. eine Grenzfrequenz, bei der der Detektor keine Intensität mehr aufzeichnet, von 680 cm^{-1} und eine Modulationseffizienz (siehe Gleichung 2-5) von 0.34 verwendet. Die Modulationseffizienz ist ein Maß für den Anteil der modulierten Strahlung an der aufgezeichneten Intensität. Sie wird beeinflusst durch die Ausrichtung des Interferometers bzw. durch Unvollkommenheiten des Strahlteilers und der Spiegel. Ein ideales Interferometer besitzt eine Modulationseffizienz von 1. Außerdem wurde eine Mertz-Phasenkorrektur durchgeführt.

$$\text{Modulationseffizienz} = \frac{I_{\max} - I_{\text{av}}}{I_{\text{av}}}$$

Gleichung 2-5 Definition der Modulationseffizienz. I_{\max} : Intensität des Maximum des Interferogramms; I_{av} : durchschnittliche Intensität des Interferogramms nach (Johnston 1991)

Um eine höhere Intensität der Strahlung im untersuchten Wellenzahlenbereich einsetzen zu können, wurden Kantenfilter mit einer oberen Frequenz von 3000 cm^{-1} bzw. 2000 cm^{-1} und einer unteren Frequenz von 1100 cm^{-1} verwendet. Diese Filter entfernen die uninteressanten Bereiche der Strahlung, die sonst unnötigerweise zum Interferogramm beitragen. Außerdem verhindern diese Filter Artefakte bei der Fourier-Transformation, wie z. B. gefaltete Signale, sowie eine unnötige thermische Belastung der Probe.

Um Wasserdampfbanden im Spektrum auszuschließen, wurden der Probenraum und die Optik des Spektrometers während der Messung mit getrockneter Preßluft gespült. Dies ist nötig, da die Schwingungsbanden von H_2O genau im untersuchten Wellenzahlenbereich liegen und eine sehr hohe Präzision der Messungen für die Differenzspektroskopie erforderlich ist.

Für die Aufnahme von Strömungsprofilen wurde der *Rapid Scan* Modus des Gerätes verwendet. Die Spiegelgeschwindigkeit und die Anzahl der gemittelten Scans wurde dabei an die erforderliche Geschwindigkeit der Messung angepaßt. Bei sehr schnellen Messungen wurde jeweils ein Interferogramm beim Vorwärts- und eines beim Rückwärtslauf des Spiegels aufgenommen. Die Messungen erfolgten im Bereich von $2250\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} .

Bei der Aufnahme der statischen Differenzspektren wurden jeweils 64 Interferogramme gemittelt. Die Messungen erfolgten von $1900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} . Anschließend wurde über mehrere Spektren gemittelt. Um bei der Mittelung eine höhere Genauigkeit zu erzielen, erfolgte eine Offset-Korrektur des erhaltenen Differenzspektrum.

Im Gegensatz dazu wurde für die Gasmessungen ein IFS 88 bzw. IFS 48 Spektrometer der Firma Bruker eingesetzt. Da die nötige Empfindlichkeit aufgrund der nicht vorhandenen Hintergrundabsorption des Wassers hier geringer ist, wurde ein DTGS-Detektor verwendet. Gemessen wurde im Bereich von $4500\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ mit einer Auflösung von 0.5 cm^{-1} . Es wurden jeweils 10 Interferogramme gemittelt. Dabei wurde das Software-Paket OPUS OS/2 der Firma Bruker verwendet.

3 Flußsystem Grundlagen und Realisierung

Um die Lösungen des Proteins und des Komplexes in die Zelle zu transportieren, ist ein hydraulisches System nötig, das im Folgenden Flußsystem genannt wird. Es besteht im Prinzip aus einer Meßzelle mit einer Zu- und einer Ableitung und einer Pumpe.

3.1 Bekannte Flußsysteme für die FTIR-Spektroskopie

Die grundlegenden Problemstellungen sollen anhand der Stopped-Flow Anordnung, die die Ausgangsbasis des konzipierten Flußsystems darstellt, erläutert werden.

Die Stopped-Flow Spektroskopie wurde zuerst für Messungen im UV/VIS-Bereich entwickelt (Gibson u. Milnes 1964). Der übliche Aufbau (siehe Abbildung 3-1) besteht aus zwei angetriebenen Spritzen, die direkt mit den Reagenzien gefüllt werden. Der Antrieb der beiden Spritzen erfolgt häufig hydraulisch. Von diesen beiden Spritzen werden die beiden Lösungen durch einen Mischer in die Zelle gepumpt. Der Fluß wird mittels einer dritten Spritze gestoppt, die sich auffüllt bis der Kolben gegen einen Stop fährt. Auf diese Weise wird der Fluß gestoppt, ohne daß es vorher zu einer Reduzierung des Volumenstroms kommt. In einigen Fällen lassen sich die beiden angetriebenen Spritzen über Ventile aus Reservoiren füllen, so daß eine mehrfache Wiederholung des Versuchs möglich ist.

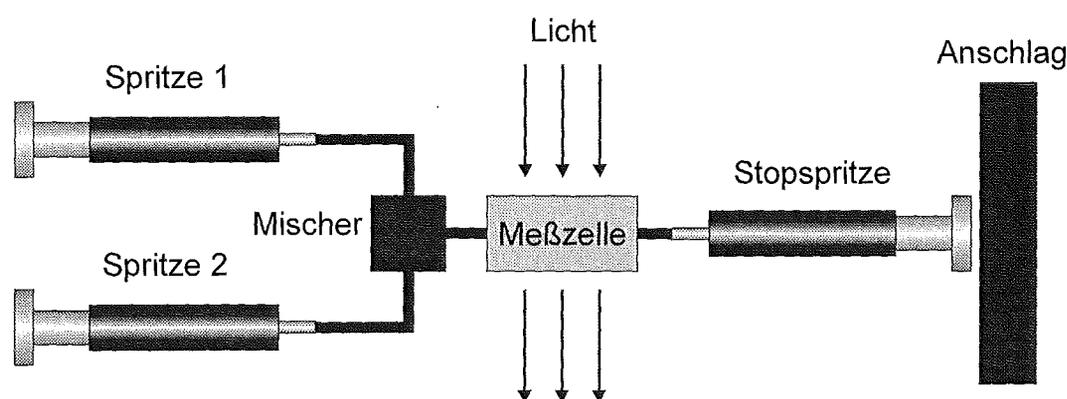


Abbildung 3-1 Stopped-Flow-System bestehend aus zwei angetriebenen Spritzen, einem Mischer, einer Meßzelle und der Stoppspritze.

Stopped-Flow-Messungen im infraroten Bereich werden erst seit kurzem durchgeführt (White et al. 1995; Dunn u. Eyring 1999). Ursache sind die widrigen Randbedingungen. Wegen der hohen Hintergrundabsorption der Lösungsmittel, v. a. bei wäßrigen Lösungen, darf die zu durchleuchtende Probestelle nur sehr dünn sein. Dies bedingt einen hohen Flußwiderstand in der Meßzelle. Die beiden bekannten Systeme verwenden einen konventionellen Aufbau (siehe Abbildung 3-1) für das Flußsystem und arbeiten mit Schichtdicken von 50 bzw. 100 μm Schichtdicke. Sie sind also nicht für Messungen in H_2O geeignet. Bei beiden Systemen wird

im *Rapid Scan* Modus gemessen, so daß die Zeitauflösung im Millisekundenbereich liegt. Der Gesamtreagenzverbrauch ist relativ hoch, da vor der ersten Messung das gesamte Flußsystem mit den beiden Reagenzien gefüllt werden muß.

Andere Flußsysteme, die den Transport nur einer Lösung in die IR-Meßzelle erlauben sind in der Literatur nicht bekannt.

3.2 Grundlagen der Strömungslehre

Wichtige charakteristische Größen des verwendeten Flußsystems, wie der Druckabfall, die Dispersion und damit der Probenverbrauch, sind von den Strömungsbedingungen abhängig. Deshalb werden im Folgenden die Grundlagen der Strömungslehre und sowie die Abhängigkeit der Dispersion und des Druckabfalls von Geometrie und Strömungsgeschwindigkeit dargestellt.

Alle in der folgenden Beschreibung der Strömungsverhältnisse verwendeten Symbole sind in Tabelle 3-1 zusammengefaßt.

Symbol	Einflußgröße
a	Breite des Flußkanals
b	Dicke des Flußkanals
c_{aus}	Konzentration am Auslaß
c_{ein}	Konzentration am Einlaß
d	Schichtdicke
$d_{\text{äq}}$	äquivalenter Durchmesser
L	Länge
Δp	Druckabfall
R	Innenradius
r	Abstand zur Rohrachse
Re	Reynoldszahl
Re_{krit}	kritische Reynoldszahl
r_{max}	Abstand zur Rohrachse für äußeren Ring
r_{min}	Abstand zur Rohrachse für inneren Ring
v	Flußgeschwindigkeit
$v(r)$	Geschwindigkeit bei Radius r
v_{krit}	kritische Flußgeschwindigkeit
V_{Probe}	Probenvolumen
V_{Rohr}	Volumen des Rohrs
V_{Zelle}	Volumen der Meßzelle
\dot{V}_{krit}	kritischer Volumenstrom
\dot{V}	Volumenstrom
\dot{V}_{Probe}	Volumenstrom der Probe
η	dynamische Viskosität
λ	Widerstandszahl
ρ	Dichte
τ	Verweilzeit

Tabelle 3-1 *Symbole und Abkürzungen der Einflußgrößen in der Strömungslehre.*

3.2.1 **Laminare und turbulente Strömung**

In der Strömungslehre unterscheidet man aufgrund des Strömungsprofils drei Arten der Strömung, die Pfropfen-, die laminare und die turbulente Strömung. Die Propfenströmung ist

eine idealisierte Strömung ohne Berücksichtigung der inneren Reibung, bei der die Flußgeschwindigkeit über den gesamten Rohrquerschnitt gleich ist. Sie tritt in der Regel in realen Systemen nicht auf. Die laminare Strömung findet man bei dünnen Rohren und kleinen Flußgeschwindigkeiten. Ihr Profil ist parabolisch. Oberhalb einer kritischen Geschwindigkeit geht die laminare Strömung durch Wirbelbildung in die turbulente Strömung über. Durch die Wirbel entstehen Kräfte, die gegen die Bewegungsrichtung wirken und daher Teilchen mit einer höheren Flußgeschwindigkeit von innen nach außen transportieren. Dadurch wird das Flußprofil abgeflacht.

$$\text{Re} = \frac{R\rho v}{\eta}$$

$$\text{Re}_{\text{krit.}} \approx 1160 \text{ für laminare Strömung}$$

$$v_{\text{krit.}} = \frac{\text{Re}_{\text{krit.}} \eta}{R\rho}$$

$$\dot{V}_{\text{krit.}} = v_{\text{krit.}} R^2 \pi$$

Gleichung 3-1 Berechnung des kritischen Volumenstroms für den Übergang zwischen laminarer und turbulenter Strömung in Kapillaren. Symbole siehe Tabelle 3-1.

Die Flußgeschwindigkeit, bei der der Übergang zwischen turbulenter und laminarer Strömung stattfindet, läßt sich aufgrund der Reynoldszahl berechnen (siehe Gleichung 3-1).

In dem beim Aufbau des Flußsystems verwendeten Kapillaren herrschen aufgrund der kleinen Innendurchmesser bei allen verwendeten Flußgeschwindigkeiten laminare Strömungsverhältnisse. Für den kritischen Volumenstrom erhält man bei einem Innenradius der Kapillaren R von 0.254 mm (0.01") und Wasser als gepumptem Medium (Dichte ρ : $0.9982 \cdot 10^3 \text{ kg/m}^3$; dynamische Viskosität η : $1.002 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$) einen kritischen Volumenstrom von 933 $\mu\text{l/s}$. Dieser hohe Volumenstrom kann mit den verwendeten Pumpen nicht erreicht werden und würde ohnehin zu einem explosionsverdächtigen Druck im System führen.

Im Folgenden werden daher die Verhältnisse bei laminaren Strömungen näher erläutert.

3.2.2 Geschwindigkeitsprofil und Dispersion bei laminaren Strömungen

Strömungen mit innerer Reibung aber ohne Wirbelbildung bezeichnet man als laminar. Durch die innere Reibung haben die einzelnen Flüssigkeitsschichten unterschiedliche Geschwindigkeiten. Bei der laminaren Rohrströmung ist die Geschwindigkeit an den Wänden Null, auf der Rohrachse am größten. Es kommt zur Ausbildung eines parabolischen Geschwindigkeitsprofils (siehe Gleichung 3-2). Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Flußgeschwindigkeit und dem Druckabfall.

$$v(r) = \frac{\Delta p}{4L\eta}(R^2 - r^2)$$

Gleichung 3-2 Parabolisches Geschwindigkeitsprofil bei laminarer Strömung in Rohren. Symbole siehe Tabelle 3-1.

Dieses Geschwindigkeitsprofil bewirkt eine unterschiedliche Verweilzeit τ der Volumenelemente in der Kapillare, die von ihrem Abstand zur Rohrachse abhängig ist. Die sich so ergebende Verteilung einer Probe in der Probenschleife zur Zeit t_0 und in der Kapillare nach einer Zeit t_1 bzw. t_2 ist in Abbildung 3-2 dargestellt.

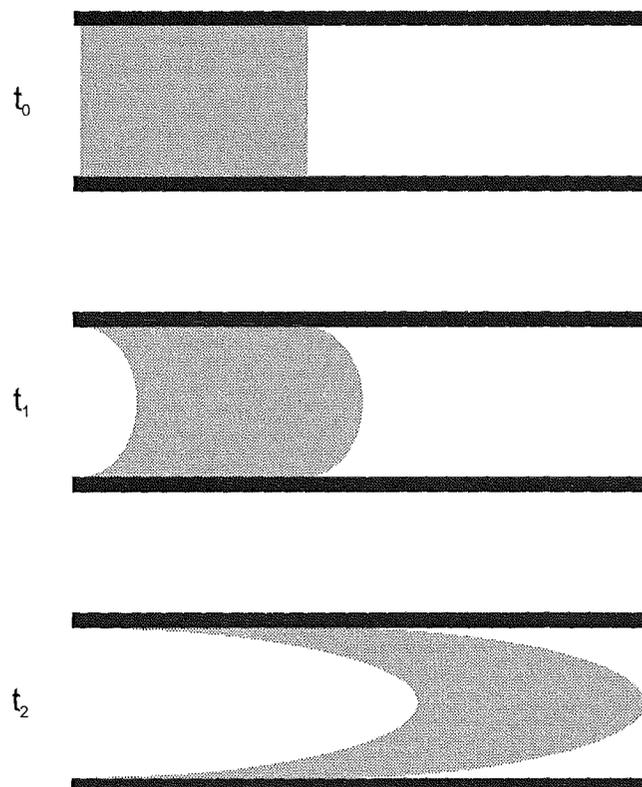


Abbildung 3-2 Verteilung der Probe in der zur Zeit t_0 (oben) und nach einer Zeit t_1 (Mitte) bzw. t_2 in der Kapillare (unten). Durch den laminaren Fluß erhält man eine parabolische Verteilung der Probe.

Durch diese parabolische Geschwindigkeitsverteilung bilden sich zur Zeit t am Ende des Kapillarrohrs mit der Länge L konzentrische Ringe (siehe Abbildung 3-3), d. h. die Probe verdünnt sich mit der Spülflüssigkeit vor und hinter der Probenschleife.

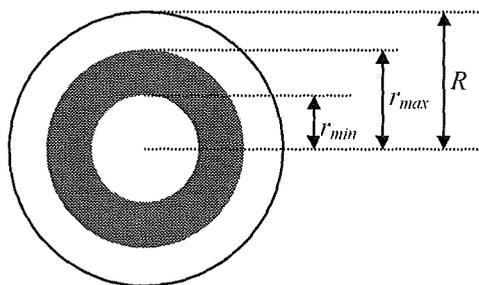


Abbildung 3-3 *Ausbildung konzentrischer Ringe zur Zeit t am Ende des Kapillarrohrs mit Länge L und Radius R .*

Die Konzentration der Probe am Austritt des Rohres, d. h. in der Zelle, errechnet sich dann wie in Gleichung 3-3 beschrieben.

Durch Einsetzen der Gleichung von Hagen-Poiseuille (siehe Gleichung 3-4) in Gleichung 3-2 erhält man:

$$r_{\max} = \sqrt{R^2 \left(1 - \frac{\tau_1}{2t}\right)} \quad \text{bei } 2t > \tau_1, \text{ sonst } r_{\max} = 0, \text{ mit } \tau_1 = \frac{V_{\text{Rohr}}}{\dot{V}}$$

$$r_{\min} = \sqrt{R^2 \left(1 - \frac{\tau_2}{2t}\right)} \quad \text{bei } 2t > \tau_2, \text{ sonst } r_{\min} = 0, \text{ mit } \tau_2 = \frac{V_{\text{Rohr}} + V_{\text{Probe}}}{\dot{V}}$$

Der Volumenstrom aus dem Bereich zwischen r_{\max} und r_{\min} ergibt sich aus:

$$\dot{V}_{\text{Probe}} = \int_0^{r_{\max}} v_r 2\pi r \cdot dr - \int_0^{r_{\min}} v_r 2\pi r \cdot dr = \frac{2\dot{V}}{R^2} \left(r_{\max}^2 - \frac{r_{\max}^4}{2R^2} \right) - \frac{2\dot{V}}{R^2} \left(r_{\min}^2 - \frac{r_{\min}^4}{2R^2} \right)$$

Die Zeitabhängigkeit von \dot{V}_{Probe} erhält man durch Einsetzen von r_{\max} und r_{\min} :

$$\dot{V}_{\text{Probe}} = \dot{V} \cdot \left(1 - \frac{\tau_1^2}{4t^2}\right) - \dot{V} \cdot \left(1 - \frac{\tau_2^2}{4t^2}\right)$$

Sammelt man die austretende Flüssigkeit in der Meßzelle am Ende des Rohres, so ergibt sich als Konzentration in der Zelle zum Zeitpunkt t :

$$\frac{c_{\text{aus}}}{c_{\text{ein}}} = \frac{\text{austretendes Probenvolumen über den Zeitraum } \Delta t}{\text{Zellvolumen}} = \frac{1}{V \Delta t} \cdot \int_{t-\Delta t}^t \dot{V}_{\text{Probe}} \cdot dt$$

Nach Einsetzen von r_{\max} und r_{\min} und mit einem Zellvolumen V_{Zelle} kleiner als V_{Probe} erhält man:

$$\int_{t-\Delta t}^t \dot{V}_{\text{Probe}} \cdot dt = \dot{V} \cdot \left(t_2 - t_1 + \frac{\tau_1^2}{4t_2} - \frac{\tau_1^2}{4t_1} \right) - \dot{V} \cdot \left(t_4 - t_3 + \frac{\tau_2^2}{4t_4} - \frac{\tau_2^2}{4t_3} \right)$$

mit: $t_1 = \text{Maximum aus } \tau_1/2 \text{ und } t - \Delta t$ $t_2 = \text{Maximum aus } \tau_1/2 \text{ und } t$
 $t_3 = \text{Maximum aus } \tau_2/2 \text{ und } t - \Delta t$ $t_4 = \text{Maximum aus } \tau_2/2 \text{ und } t$

Gleichung 3-3 *Berechnung des theoretischen Konzentrationsverlaufs am Auslauf des Rohres bei einem Probenvolumen V_{Probe} und einer Zelle mit dem Volumen V_{Zelle} . Es wird jeweils die Konzentration der im Zeitraum zwischen $t-\Delta t$ und t austretenden Flüssigkeit berechnet. Symbole siehe Tabelle 3-1.*

Durch das parabolische Geschwindigkeitsprofil erhält man eine Dispersion der Probe im Rohr. Diese ist abhängig von der Verweilzeit der Probe. Bei steigender Verweilzeit vergrößert sich die Dispersion. Da die Flußgeschwindigkeit auf der Rohrachse doppelt so groß ist wie die Durchschnittsgeschwindigkeit, kommen die ersten Probenmoleküle schon nach $\tau/2$ in der Zelle an. Der Peak ist asymmetrisch, da für den Abfall der Konzentration eine andere Verweilzeit gilt, die sich aus dem Volumen von Zuleitungen plus Probenschleife berechnet. Dadurch wird der Abfall der Konzentration flacher als der Anstieg.

Durch eine Verringerung des Volumens V_{System} , d. h. eine Verkürzung der Kapillare oder eine Verkleinerung des Innendurchmessers, erhält man eine geringere Verweilzeit und damit eine Verringerung der Dispersion. Dadurch wird das benötigte Probenvolumen reduziert. Die Länge der Kapillaren kann allerdings aufgrund der Geometrie der Apparatur nicht beliebig verkürzt werden.

Eine Verkleinerung des Innenradius der Kapillare hat bei gleichbleibendem Volumenstrom einen Anstieg des Druckabfalls in der Kapillare zur Folge. Gleichzeitig wird die laterale Flußgeschwindigkeit v größer, so daß mit geringeren Volumenströmen gearbeitet werden kann.

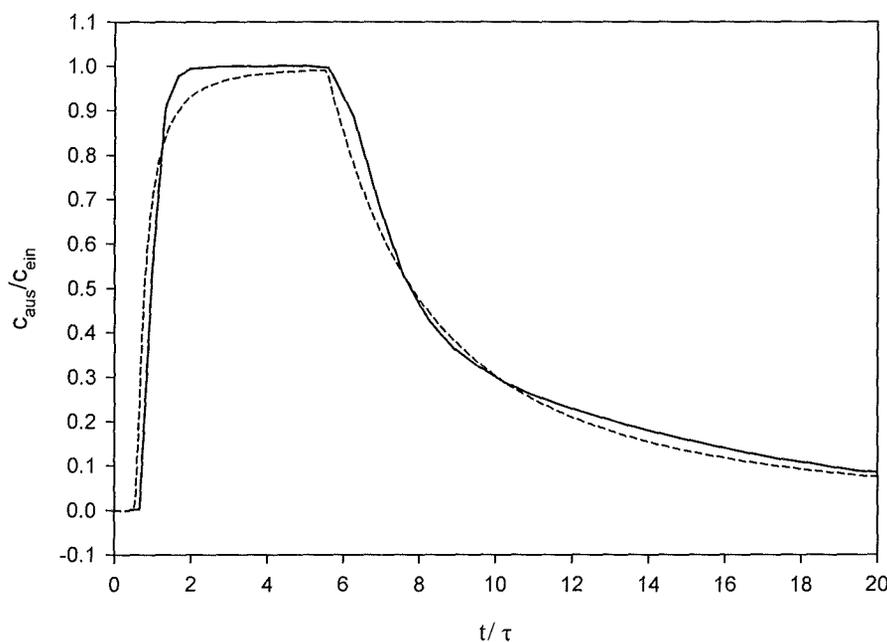


Abbildung 3-4 Vergleich des gemessenen Strömungsprofils (durchgezogene Linie) mit dem nach Gleichung 3-3 berechneten (gestrichelte Linie). $r=0.1524 \text{ mm}$ ($0.006''$), $V_{\text{Probe}}=50 \mu\text{l}$, $V_{\text{Zelle}}=(5 \text{ mm})^2 \cdot \pi \cdot 10 \mu\text{m}$ entsprechend dem durchstrahlten Volumen, $\dot{V}=8.33 \mu\text{l/s}$, $\tau_1=0.6 \text{ s}$, $\tau_2=6.6 \text{ s}$.

Das theoretische Strömungsverhalten wurde mit dem experimentell ermittelten verglichen. Dazu wurde die Absorption einer Probe ($0.1 \text{ M K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; $\tilde{\nu}=2039 \text{ cm}^{-1}$) in der Zelle zu unterschiedlichen Zeiten t während des Flusses gemessen. Das Verhältnis $A(t)/A_{\text{max}}$ entspricht $c_{\text{aus}}/c_{\text{ein}}$, dabei ist A_{max} die mit einer vollständig gefüllten Meßzelle ermittelte Absorption. Wie in Abbildung 3-4 zu sehen, weist das gemessene Strömungsprofil geringe Abweichungen von dem theoretisch ermittelten auf. Sowohl der Anstieg der Konzentration als auch ihr Abfall sind im realen System steiler als in der Berechnung. Diese Abweichungen lassen sich durch Zonen mit dem Charakter eines idealen Strömungsrohrs bzw. mit

turbulenter Strömung erklären. Sie können durch Diffusion der Probe im Rohr (axial und radial) und durch Turbulenzonen, d. h. Stellen mit vollständiger radialer und teilweiser axialer Durchmischung bedingt sein. Als Turbulenzonen kommen z. B. die Anschlüsse sowie der Übergang zwischen Kapillare und Zelle in Frage. Die in Kapitel 3.2.1 beschriebene Abschätzung für die Übergangsgeschwindigkeit zwischen laminarer und turbulenter Strömung gilt für diese Bereiche nicht.

Die Dispersion hat hauptsächlich Auswirkungen auf das benötigte Probenvolumen. Die einströmende Substanz verdrängt die vorhandene Flüssigkeit nicht wie bei der idealisierten Propfenströmung, sondern es kommt in den Randbereichen zur Vermischung und damit zur Verdünnung der Probe. Dadurch erhöht sich das Probenvolumen, das für einen vollständigen Austausch des Zellinhalts benötigt wird (Abbildung 3-4, Plateau).

3.2.3 Druckabfall in laminar durchströmten Systemen

Druckabfall in Kapillaren

Der Druckabfall in laminar durchströmten Kapillaren läßt sich nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille (siehe Gleichung 3-4) berechnen, das man durch Integration aus der Gleichung 3-2 erhält:

$$\Delta p = \frac{8 \dot{V} \eta L}{\pi R^4}$$

Gleichung 3-4 *Gesetz von Hagen-Poiseuille über die laminare Strömung durch Kapillaren. Symbole siehe Tabelle 3-1.*

Die starke Abhängigkeit des Druckabfalls vom Radius der verwendeten Kapillaren ist deutlich zu erkennen. Bei Verringerung der Innenradien der Kapillaren steigt der Druckabfall mit der vierten Potenz an. Im Hinblick auf den Druckabfall und damit die benötigte Pumpenleistung sind daher möglichst große Radien wünschenswert. Allerdings steigt mit dem Radius bei gegebener Länge auch das Volumen quadratisch an. Dies erhöht die Verweilzeit und damit die Dispersion der Probe im Flußsystem.

Druckabfall in der verwendeten Flußzelle

Der Druckabfall im System ist einer der wesentlichen Einflußfaktoren bei der Realisierung der Zellen. Daher soll an dieser Stelle eine Abschätzung des Druckabfalls durchgeführt werden.

Aufgrund der hohen Infrarotabsorption des Wassers bei 1645 cm^{-1} lassen sich nur Schichtdicken unter $10\text{-}12 \text{ }\mu\text{m}$ für die Spektroskopie in wäßrigen Lösungen verwenden. Der

Flußkanal in der Zelle läßt sich daher näherungsweise als Rechteckrohr mit Breite a und Dicke b beschreiben. Dabei gilt, daß $a \gg b$. Für ein solches System läßt sich der Druckabfall folgendermaßen berechnen:

Allgemein gilt für den Druckverlust das Newton'sche Widerstandsgesetz :

$$\Delta p = \lambda \frac{L}{d_{\text{äq}}} \rho \frac{v^2}{2}$$

Bei glatten Rohren und laminarer Strömung gilt für die Widerstandszahl λ :

$$\lambda = \frac{A}{\text{Re}} \quad \text{mit } A = 96 \text{ für einen Langspalt und } \text{Re} = \frac{v d_{\text{äq}} \rho}{\eta}$$

Für den äquivalenten Durchmesser von Rechteckrohren gilt :

$$d_{\text{äq}} = \frac{2ab}{a+b} \quad \text{mit } a \gg b, \text{ folgt :}$$

$$d_{\text{äq}} = 2b$$

Damit erhält man für den Druckabfall :

$$\Delta p = A \cdot \eta \cdot \frac{L}{d_{\text{äq}}^2} \cdot \frac{v}{2}$$

Für die Flußgeschwindigkeit gilt :

$$v = \frac{\dot{V}}{ab}$$

Für den Druckabfall in einem Rechteckrohr gilt also :

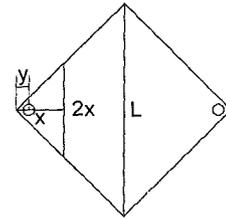
$$\Delta p = \frac{A}{8} \cdot \eta \cdot \frac{L}{ab^3} \cdot \dot{V}$$

Gleichung 3-5 *Druckabfall in einem Rechteckrohr für $a \gg b$. Symbole siehe Tabelle 3-1.*

Die quadratische oder rautenförmige Geometrie des Spacers der verwendeten Zelle (siehe Abbildung 3-7) läßt sich durch Verwendung unendlich vieler Rechteckrohre mit Länge dL , die jeweils die Breite des Spacers an dieser Stelle besitzen, nähern. Die Berechnung des Druckabfalls in einer solchen Zelle ist in Gleichung 3-6 beschrieben.

Für die Geometrie soll $a = 2x$ gelten, dann erhält man nach Integration :

$$\int_{\text{Beginn}}^{\text{Ende}} \frac{dx}{a} = \frac{1}{2} \int_y^{L/2} \frac{1}{x} dx = \frac{1}{2} \cdot \left(\ln\left(\frac{L}{2}\right) - \ln y \right)$$



Nach Einsetzen in die Gleichung für den Druckabfall :

$$\Delta p = \frac{A}{8} \cdot \eta \cdot \frac{\dot{V}}{b^3} \cdot \frac{1}{2} \cdot \left(\ln\left(\frac{L}{2}\right) - \ln y \right)$$

Gleichung 3-6 Druckabfall in einer Zelle mit quadratischer Geometrie. Es gilt: $a=2x$ mit x : Abstand Ecke zum Berechnungspunkt, y : Abstand Eintritt der Flüssigkeit zur Ecke. Symbole siehe Tabelle 3-1.

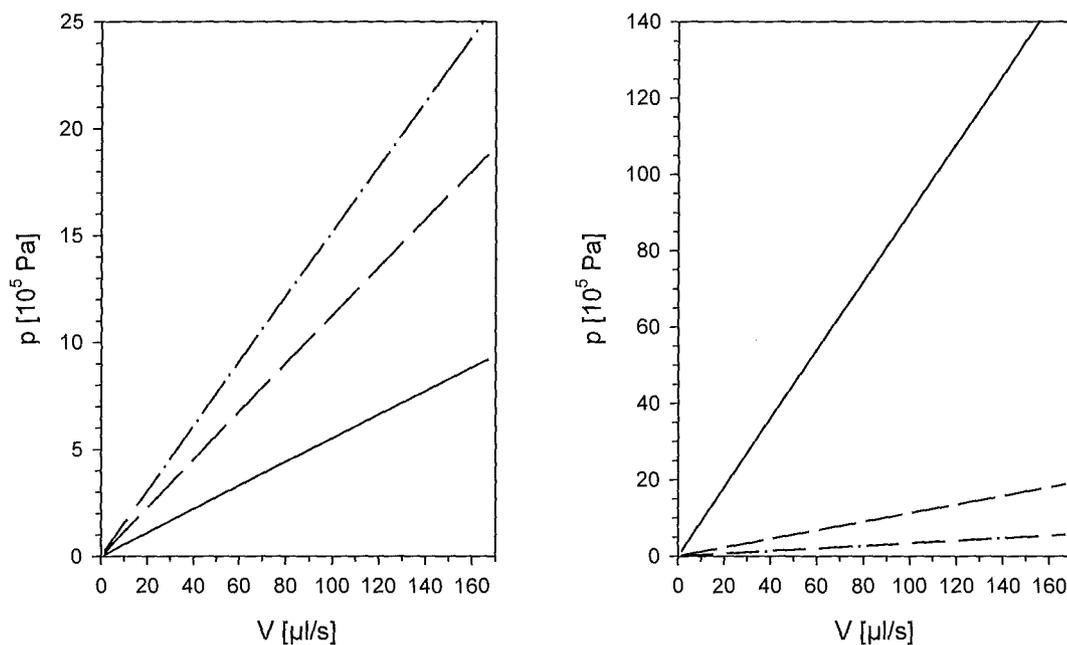


Abbildung 3-5 Abhängigkeit des Druckabfalls von der Länge L der Zelle (rechtes Diagramm): mit $L=10$ mm (\longrightarrow), 26 mm ($- -$) und 50 mm ($- \cdot -$) sowie von der Schichtdicke b (linkes Diagramm): mit $b=5$ μ m (\longrightarrow), 10 μ m ($- -$) und 15 μ m ($- \cdot -$).

Auch hier ist eine starke Abhängigkeit des Druckabfalls von der Schichtdicke gegeben. Eine Integration der Schichtdicke über den gesamten Spacer bei Eintritt der Flüssigkeit im Eckpunkt ist nicht möglich, da der Druckabfall sonst gegen unendlich strebt. Dies ist leicht zu erklären, da der Fluß so durch einen unendlich kleinen Querschnitt geht. In der realen Zelle liegt der Eintrittspunkt 2 mm außerhalb der Ecke. Eine Verkleinerung des Quadrats hat eine Reduktion des Druckabfalls zur Folge, da die Zelle dann aus weniger Rechteckzellen zusammengesetzt ist, und jedes Rechteck einen Beitrag zum Druckabfall liefert. Die

Abhängigkeit des Druckabfalls von der Länge der Zelle und der Schichtdicke ist in Abbildung 3-5 dargestellt.

Eine Abschätzung des Druckabfalls ergibt, daß der Druckabfall in der Meßzelle größer ist als der in den Kapillaren. Je nach Flußgeschwindigkeit können Drücke zwischen $5 \cdot 10^5$ und $3 \cdot 10^6$ Pa erreicht werden. Durch das Auftreffen der Flüssigkeit auf das Fenster am Einlaß der Zelle kann der reale Druckabfall bis zu einem Faktor 2 höher liegen. In den Kapillaren findet ca. 30-50% des gesamten Druckabfalls statt der Rest des Druckabfalls in der Zelle.

3.3 Realisierung des Flußsystems

Basierend auf käuflichen Komponenten sollte ein Versuchsaufbau entwickelt werden, mit dem die FTIR-spektroskopische Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen möglich ist. Die Apparatur sollte folgende Eigenschaften besitzen:

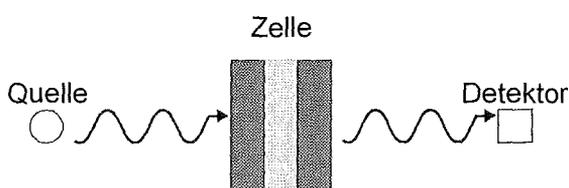
- Druckstabilität und Dichtheit
- geringer Probenverbrauch, d. h. geringes Austauschvolumen
- Signalstabilität trotz Druck (Aufweitung der Zelle) und Adsorption

Im Folgenden werden daher unterschiedliche Anordnungen dargestellt und Verbesserungsmöglichkeiten aufgezeigt.

3.3.1 Zellen

Bei der FTIR-Spektroskopie von Flüssigkeiten gibt es zwei unterschiedliche Prinzipien, die Transmissions- und die ATR-Messung (siehe Abbildung 3-6). Bei Transmissionsmessungen wird die Flüssigkeit vollständig durchstrahlt. Die Zelle besteht dabei aus zwei für Infrarotstrahlung durchlässigen Fenstern, zwischen denen die Flüssigkeit eingeschlossen ist. Der Abstand zwischen den beiden Fenstern entspricht der optischen Weglänge des Strahls durch die Flüssigkeit. Um Brechungs- und Reflexionseffekte beim Übergang zwischen Fenster und Flüssigkeit zu vermeiden, sollte das Fenstermaterial so gewählt werden, daß sich die beiden Brechzahlen möglichst wenig unterscheiden.

Transmissionsmessung



ATR-Messung

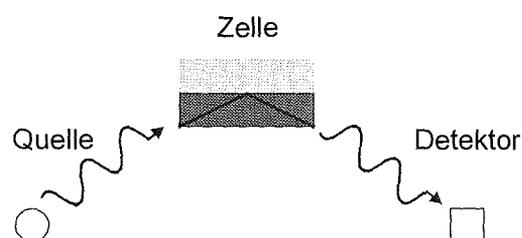


Abbildung 3-6 Prinzipien zur FTIR-Spektroskopie an Flüssigkeiten.

Ein andere Möglichkeit sind Messungen, die auf dem Effekt der abgeschwächten Totalreflexion (*attenuated total reflection, ATR*) beruhen. Dabei läuft der Strahl durch einen Kristall mit einer hohen Brechzahl. Trifft der Strahl auf die Grenzfläche zur angrenzenden Flüssigkeit, kommt es zur Totalreflexion. Dabei dringt der Strahl in die angrenzende Flüssigkeit ein. Die optische Weglänge ist dabei abhängig von der Eindringtiefe und der Anzahl der Reflexionen. Da die Messung nur in der Grenzschicht zwischen Kristall und Flüssigkeit stattfindet, können Grenzflächenphänomene die Messung verfälschen.

3.3.2 Transmissionszelle

Für Messungen in Transmission wurde eine käufliche zerlegbare Durchflußzelle (Fa. Spectra Tech) verwendet, die nach Angaben des Herstellers nur für niedrige Drücke ($1\text{-}2\cdot 10^5$ Pa) geeignet ist. Diese Zelle ist in Abbildung 3-7 skizziert. Sie besteht aus einem Metallgehäuse, in das zwei CaF_2 -Fenster (c,e) gelegt werden, die durch einen $10\text{-}15\ \mu\text{m}$ dicken Teflonspacer bzw. $6\text{-}8\ \mu\text{m}$ Mylarspacer (d) getrennt sind. Soweit nicht anders angegeben, wurden in dieser Arbeit Teflonspacer verwendet.

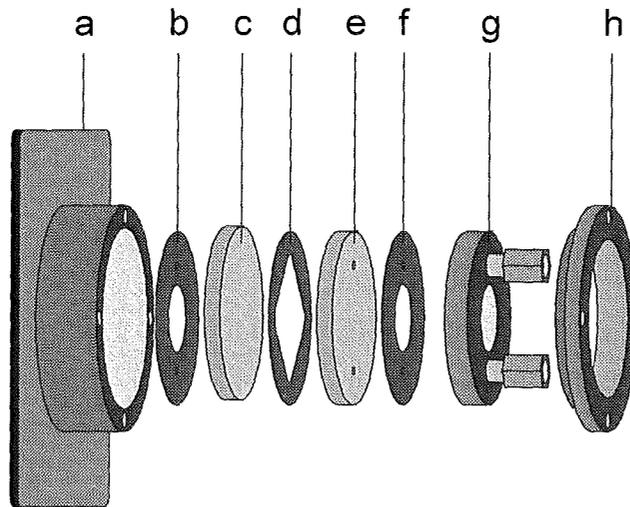


Abbildung 3-7 Skizze der verwendeten Zelle (Fa. Spectra Tech). a: Gehäuse, b,f: Teflondichtungen, c: CaF_2 -Fenster, d: Spacer, e: CaF_2 -Fenster mit Bohrungen, g: Nadelplatte, h: Kompressionsring.

In ersten Versuchen erwies sich die Zelle an einigen Stellen als undicht:

1. Die standardmäßigen Luer Lock-Anschlüsse halten den auftretenden Drücken nicht stand, und springen leicht ab.
2. Zwischen Nadelplatte und oberer Teflondichtung dringt Wasser ein.
3. Durch den hohen Druck, der beim Pumpen auftritt, dringt Wasser zwischen die Fenster und den Spacer ein. Dadurch kommt es zu Änderungen der Schichtdicke.

Durch Modifikationen der Zelle konnten diese Undichtigkeiten sukzessive unterbunden werden. Die standardmäßigen Luer Lock-Anschlüsse wurden daher herausgenommen und Gewinde in die Nadelplatte geschnitten, in die HPLC-Verschraubungen gesetzt wurden. Das vordere Fenster, durch das die Lösung eingespritzt wird, wurde auf die Vorderplatte des Gehäuses geklebt. Dadurch wurde eine bessere Abdichtung der Zelle erreicht. Mit der so modifizierten Zelle können Flußgeschwindigkeiten bis zu $167\ \mu\text{l/s}$ realisiert werden, ohne daß die Zelle undicht wird oder bricht. Allerdings stellt die Zelle aufgrund der geringen Schichtdicke einen sehr hohen Widerstand für den Fluß dar. Dies hat eine hohe Druck-

belastung der Zelle zur Folge, die eine Vergrößerung des Abstands zwischen den Fenstern während des Pumpens bedingt. Die Charakterisierung der Zelle und nähere Details des Verhaltens während des Pumpens sind in Kapitel 3.3.4.2 beschrieben.

3.3.3 ATR-Zelle

Parallel zu den Versuchen mit der Transmissionszelle wurden Versuche mit einer ATR-Durchflußzelle (Doyle 1991) unternommen. Das Prinzip der ATR-Zelle ist in Abbildung 3-8 dargestellt. Der IR-Strahl tritt über einen Reflektor in den ATR-Kristall ein. Die beiden Abschirmungen verhindern, daß Licht in den Kristall eindringen kann, das den Kristall ohne Reflexionen passiert. Über einen zweiten Reflektor tritt das Licht aus dem Kristall aus. Die erreichte Schichtdicke ist unabhängig vom Querschnitt des Flußkanals. Die ATR-Zelle besitzt daher einen deutlich geringeren Flußwiderstand.

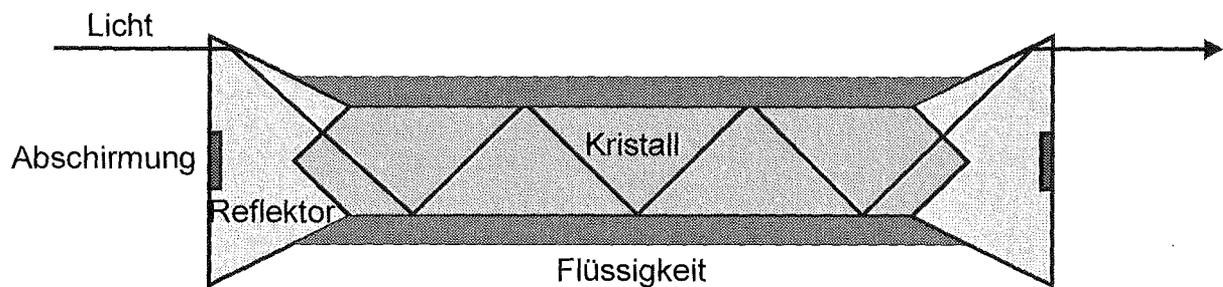


Abbildung 3-8 Das Prinzip der verwendeten ATR-Zelle.

In den Versuchen mit dieser Zelle sind 250 µl der Mischung nötig, um den Zellinhalt vollständig auszutauschen. Das interne Volumen der ATR-Zelle wird herstellerseitig mit 40 µl angegeben. Das notwendige Volumen entspricht also dem 6-fachen Zellinhalt. Dieses Austauschverhalten ist bedingt durch die Dispersion in den Kapillaren (siehe Kapitel 3.3.5.2) und durch die Dispersion in der Zelle. Eine Reduktion wäre daher, durch Verringerung des Innendurchmessers der Kapillaren, möglich. Allerdings können 50-100 µl wohl nicht unterschritten werden.

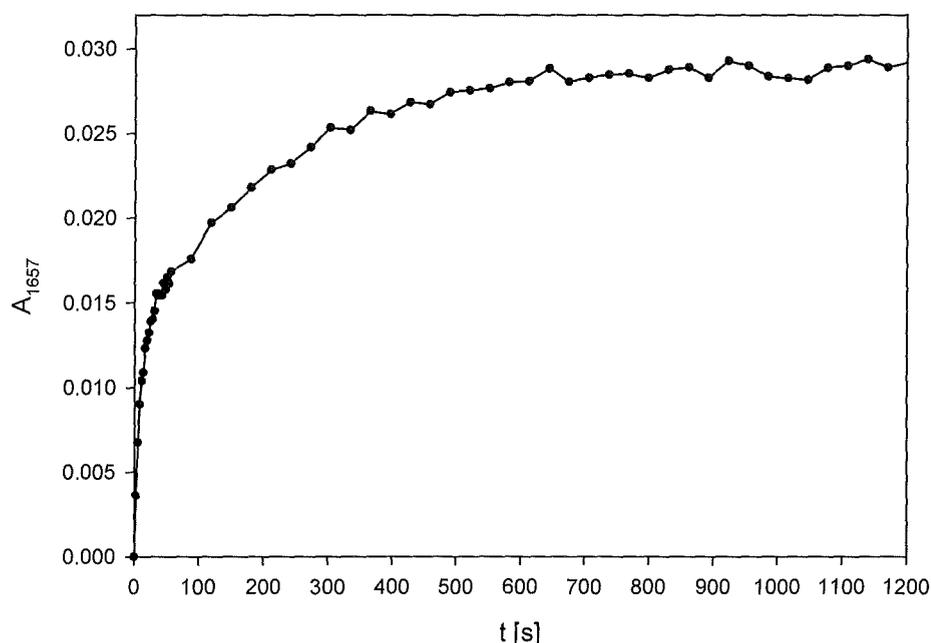


Abbildung 3-9 Adsorption von Cytochrom c oxidiert $c = 4 \text{ mM}$ an den ATR-Kristall. Zunahme der Absorption nach dem Stoppen.

Ein prinzipielles Problem der ATR-Zelle stellt die, nach dem Stoppen des Flusses erfolgende, Adsorption der Proteinmoleküle an den Kristall dar. Abbildung 3-9 zeigt die Absorption der Amid I Bande von Cytochrom c ($\tilde{\nu} = 1657 \text{ cm}^{-1}$) in Abhängigkeit von der Zeit nach dem Stoppen des Flusses. In den ersten 60 Sekunden nach dem Stoppen des Flusses ist eine deutliche Zunahme der Absorption zu erkennen. Diese Zunahme läßt sich durch eine Adsorption des Proteins an den Kristall erklären, die eine Konzentrationserhöhung in der gemessenen Schicht zur Folge hat. Diese Adsorption führt zu Störungen in der Messung. Differenzmessungen können daher erst nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes durchgeführt werden, oder es kommt zu einer Überlagerung der Reaktion mit dem Adsorptionsvorgang. Nur in einigen Fällen kann davon ausgegangen werden, daß eine Separation der beiden Kinetiken möglich ist. Außerdem läßt sich die so entstandene Schicht nur schlecht wieder vom Kristall herunter spülen. Dies kann zu Verschleppungen von Probenmaterial führen.

Gleichzeitig kann es durch die Adsorption zu einem deutlichen Unterschied in der Reaktionsfähigkeit des Proteins kommen. Im schlechtesten Fall wird das aktive Zentrum durch die Adsorption blockiert und die Reaktion kann nicht mehr ablaufen.

Eine ATR-Zelle scheint aus den genannten Gründen für die Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen nicht geeignet, obwohl sie in Bezug auf die Druckbelastung der Proteine deutliche Vorteile zeigt. Eventuell ist es möglich, das zu untersuchende Protein gezielt auf dem ATR-Kristall zu immobilisieren, ohne daß die Ligandenbindungsfähigkeit

verloren geht. Mit nur einer Proteincharge können dann mehrere Liganden untersucht werden. Dabei muß zusätzlich gewährleistet sein, daß die Bindung reversibel ist und sich der Ligand durch Verdünnung aus dem Komplex herauslösen läßt. Diese Lösung ist daher auf jeden Fall nicht universell einsetzbar.

Im Folgenden wird die Transmissionszelle verwendet, da hier keine Probleme mit der Adsorption der Proteine auftreten.

3.3.4 Aufbau des Flußsystem

3.3.4.1 Layout des Flußsystems

Stopped-Flow Aufbau mit Zweikanalspritzenpumpe

In einem ersten Versuchsaufbau zur Verwendung von Stopped-Flow-Verfahren zur reaktionsinduzierten FTIR-Differenzspektroskopie in einer Transmissionszelle mit 10 µm Schichtdicke wurde eine Zweikanalspritzenpumpe der Firma Hamilton eingesetzt (Masuch 1997). Diese wurde, wie in konventionellen Stopped-Flow Systemen üblich, mit Lösungen der beiden Reaktanden gefüllt. Als Mischer wurden ein einfaches T-Stück bzw. ein Zwei-Wege-Ventil eingesetzt. Als Zelle wurde die oben beschriebene Spectra Tech Transmissionszelle benützt. Als Zuleitungen dienten Teflonschläuche, die über die Luer Lock Verbindungen mit der oberen Platte der Zelle verbunden wurden. Mittels dieses Flußsystems war es möglich statische Spektren der pH-induzierten Konformationsänderung von Cytochrom c aufzunehmen. Auch erste kinetische Messungen konnten durchgeführt werden. Allerdings besitzt dieses System mehrere Nachteile. Das Totvolumen ist sehr groß, da alle Zuleitungen vollständig mit den zu untersuchenden Substanzen gefüllt werden müssen. Die Länge der Zuleitungen kann nicht beliebig verkleinert werden, da die Pumpe nur außerhalb der Probenkammer des Spektrometers aufgestellt werden kann. Aufgrund des nötigen hohen Druckes zum Einspritzen wird der Ventilkopf nach ca. einem Monat undicht. Außerdem kommt es zu Ablagerungen der Proteine auf den Ventilkappen, die ebenfalls zur Zerstörung beitragen. Es konnten keine Flußgeschwindigkeiten über 20 µl/s erreicht werden. Diese Geschwindigkeit ist zum Erreichen einer vollständigen Mischung eventuell nicht ausreichend. Außerdem ergibt sich eine lange Totzeit zwischen Mischkammer und Meßzelle. Aufgrund des hohen Druckunterschiedes zwischen Eingang und Ausgang der Zelle, der sich nach dem Abschalten der Pumpe nur über die Zelle abbauen kann, läuft die Flüssigkeit nach dem Abschalten noch einige Sekunden nach, was die Signalstabilität beeinträchtigt.

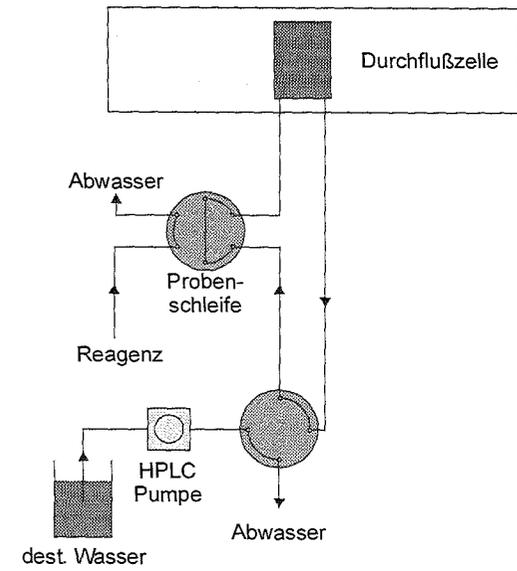
Aufbau mit Probenschleifenventil und HPLC-Pumpe zur Reduktion des Proben- volumens

Ausgehend von den Erfahrungen mit diesem Aufbau wird in dieser Arbeit ein neues Konzept für das Flußsystem verwendet. Mit Hilfe dieses Flußsystems sollen unterschiedliche Lösungen in die Zelle transportiert werden. Das Mischen von zwei Lösungen ist nicht vorgesehen. Durch Verwendung einer Probenschleife aus der HPLC soll das benötigte Probenvolumen drastisch reduziert werden. Der Aufbau dieser Anlage ist in Abbildung 3-10 dargestellt. Die Förderung der Flüssigkeiten erfolgt durch eine HPLC-Pumpe. Zwei Ventile sorgen für die Steuerung des Flusses. Eines dieser Ventile dient als Injektor für die Lösungen. In Stellung 1 von Abbildung 3-10 kann die Probenschleife gefüllt werden. Gleichzeitig wird zur Reinigung destilliertes Wasser durch das System gepumpt. Nach dem Füllen wird das Probenschleifenventil geschaltet, und das von der Pumpe geförderte Wasser drückt die Lösung in die Meßzelle (Stellung 2). Sobald sich die Probe in der Meßzelle befindet wird durch Schalten des dritten Ventils der Fluß durch die Zelle gestoppt (Stellung 3). Dabei wird der Flüssigkeitsstrom der Pumpe ins Abwasser umgeleitet. Um das Nachlaufen der Lösung nach dem Stoppen zu verhindern, werden die Zu- und die Ableitung der Zelle kurzgeschlossen, so daß der Druckausgleich nicht über die Zelle sondern über den Kurzschluß und damit widerstandsfrei stattfindet. Nach dem Stoppen beginnt die Messung. Im Prinzip können die Probenschleifen schon während der Messung neu gefüllt werden.

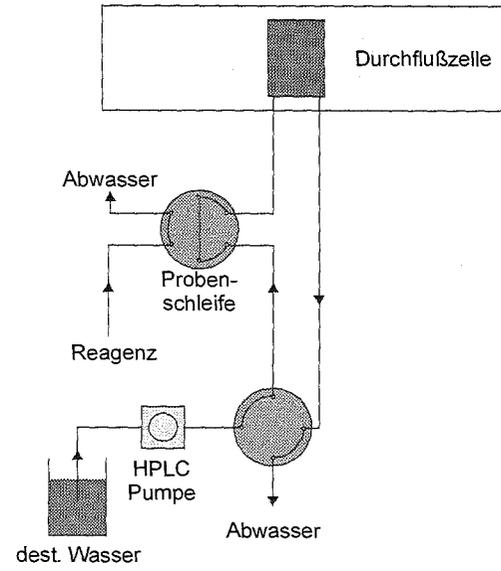
Die Schaltung der Ventile erfolgt über ein in unserem Arbeitskreis entwickeltes Computerprogramm. Dazu übermittelt das Programm TTL-Signale von der parallelen Schnittstelle an die Steuermodule der einzelnen Ventile. Gleichzeitig kann zu einem beliebigen Zeitpunkt innerhalb des Schaltzyklusses ein Triggersignal an das FTIR- bzw. UV/VIS-Spektrometer gesendet werden.

Die verwendete HPLC-Pumpe sowie Ventile, Leitungen und Verschraubungen sind für hohe Drücke bis zu $1.1 \cdot 10^7$ Pa und Flußgeschwindigkeiten bis zu $667 \mu\text{l/s}$ geeignet. Die Verwendung eines zweiten Ventils zum Stoppen des Flusses hat eine geringere Stopzeit und eine geringere Beanspruchung der Pumpe zur Folge, da kein Abschalten der Pumpe mehr notwendig ist. Die Pumpe kommt nur noch mit destilliertem Wasser in Berührung, so daß keine Salz- oder Proteinablagerungen mehr zu befürchten sind. Zwischen den Messungen kann das gesamte System inklusive der Probenschleifen problemlos mit Wasser gespült werden. Es herrschen daher vor jeder Messung reproduzierbare Bedingungen.

3. Stoppen des Flusses, Messung



2. Einspritzen der Probe



1. Füllen der Probenschleife

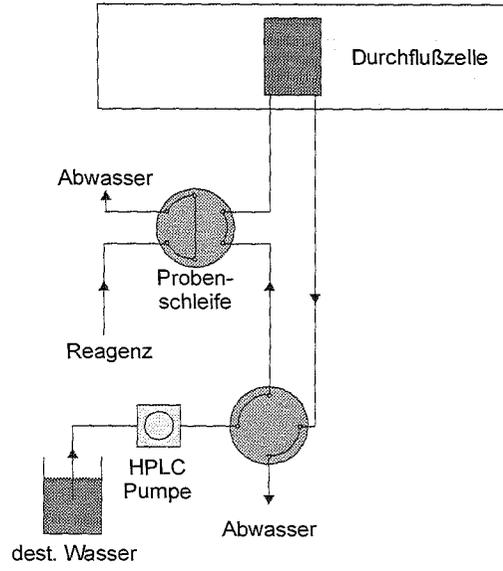


Abbildung 3-10

Aufbau des Flußsystems. Dargestellt sind alle Schaltungen des Zyklus.

3.3.4.2 Charakterisierung

Druckabfall im Flußsystem

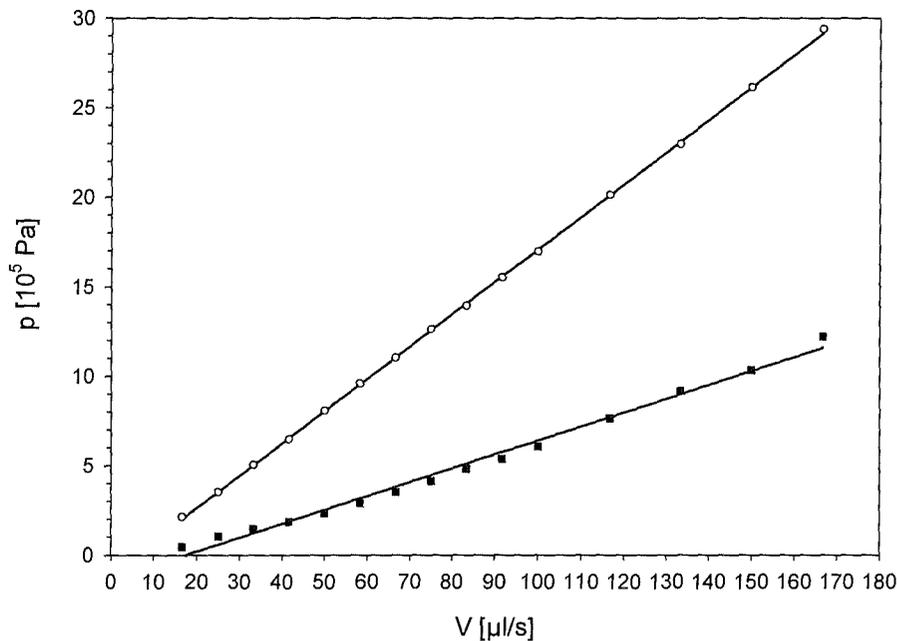


Abbildung 3-11 Druckabfall im Flußsystem beim Pumpen mit unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten V mit (O) und ohne Zelle (■).

Die Zelle stellt aufgrund der geringen Schichtdicke einen großen Widerstand für die Strömung dar. Der zum Pumpen benötigte Druck ist mit dieser Zelle ca. 2-3 mal so hoch wie in der Apparatur ohne Zelle (siehe Abbildung 3-11). Aus theoretischen Überlegungen (siehe Gleichung 3-6) erhält man bei einer Flußgeschwindigkeit von $83.3 \mu\text{l/s}$, einer Länge der Raute von 26 mm und einer Eintrittsposition y von 2 mm sowie einer Schichtdicke von $12 \mu\text{m}$ einen Druckabfall in der Zelle von $5.4 \cdot 10^5 \text{ Pa}$. Dieser Wert liegt unter dem experimentell ermittelten Wert von 10^6 Pa . Diese Unterschätzung des tatsächlichen Wertes läßt sich durch Effekte beim Auftreffen der Strömung auf das Fenster und die abknickende Richtung des Flusses erklären.

Austauschvolumen

Zum Austausch des gesamten Zellinhalts werden mindestens $250 \mu\text{l}$ der Lösung benötigt (siehe Abbildung 3-12). Dies entspricht dem in den Vorversuchen mit der Zweikanalspritzenpumpe ermittelten Volumen. Das Volumen der Zelle beträgt dabei nur ca. $7 \mu\text{l}$. In weiteren Versuchen wurde festgestellt, daß das hohe Austauschvolumen nicht durch eine schlechte Durchströmung der Zelle, sondern vielmehr durch das parabolische Strömungsprofil in den Zuleitungen und die dadurch entstehende Dispersion bedingt ist (siehe Kapitel 3.2.2) (Masuch 1999).

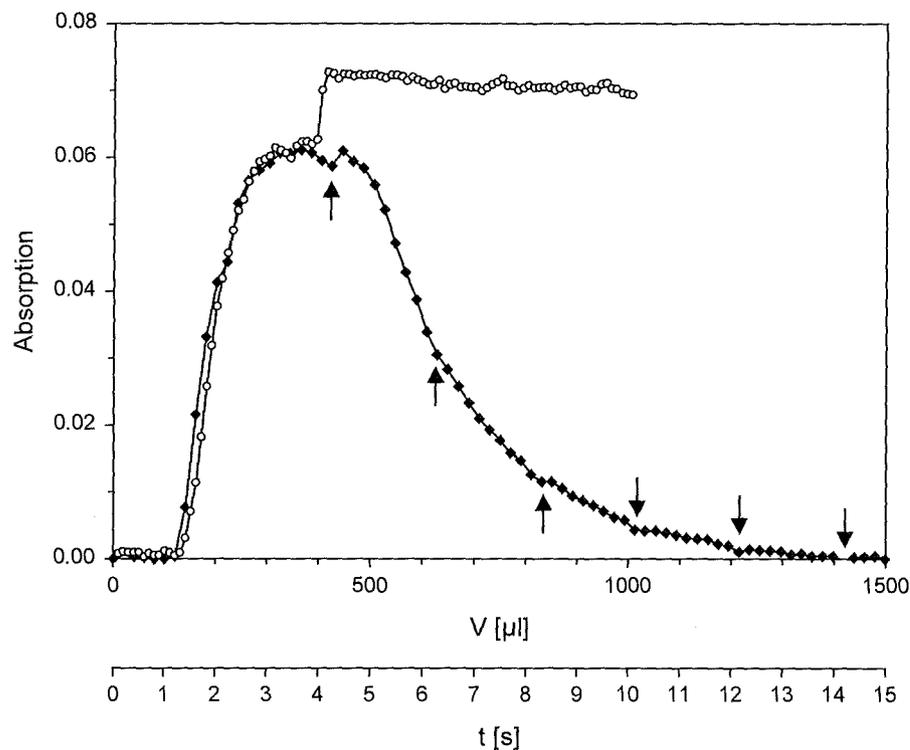


Abbildung 3-12 Flußprofil in der Zelle nach Einspritzen von $500 \mu\text{l}$ 50 mM Ferricyanid-lösung (◆). Beim Stoppen des Flusses kommt es zu einem Drucksprung im System, der eine Vergrößerung der Schichtdicke und deshalb eine größere Absorption zur Folge hat (O). $\lambda_{\text{max}}(\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})]_6) = 418.4 \text{ nm}$. Die Pfeile markieren die Abnahme des Signals durch den Kolbenhub.

Signalstabilität

Beim Stoppen des Flusses kommt es zu einem starken und schlagartigen Anstieg des gemessenen Signals (siehe Abbildung 3-12). Dieser ist bedingt durch den Kurzschluß zwischen Einlaß und Auslaß der Zelle, der einen Druckausgleich über die Leitungen anstelle über die Zelle ermöglichen und so das lange Nachlaufen der Flüssigkeit verhindern sollte. Nach dem Stoppen des Flusses gleicht sich der Druck im System über den Kurzschluß aus. Verursacht durch den Bernoulli-Effekt sowie durch den Druckausgleich zwischen Zuleitung (Hochdruck) und Ableitung (Niederdruck) ist der anschließend herrschende statische Druck größer als der mittlere, statische Druck in der Zelle während des Pumpens. Dadurch kommt es zu einer Aufweitung der Schichtdicke und damit zu einer Zunahme des Signals. Der nach dem Stoppen in der Zelle herrschende Druck baut sich vermutlich langsam über kleine Undichtigkeiten im System ab. Dadurch nehmen die Schichtdicke und damit die gemessene Absorption wieder ab. Die erzielte Signalstabilität reicht so für die FTIR-Differenzspektroskopie nicht aus.

Alle 200 Mikroliter, entsprechend dem Hubvolumen der HPLC-Pumpe, kommt es zu einer kleinen Abnahme des Signals (siehe Abbildung 3-12), die durch die Abnahme des Drucks im System beim Zurückziehen des Kolbens der HPLC-Pumpe hervorgerufen wird. Die Abnahme des Drucks wird durch eine Verringerung der Schichtdicke sichtbar. Diese Störgröße läßt sich durch Verwendung von Spritzenpumpen oder bei einem Kolbenvolumen, das größer ist als das gepumpte Volumen, durch die Synchronisation des Starts der Messung mit dem Kolbenhub vermeiden.

Schaltzeit der Ventile

Die Zeitauflösung des Systems wird bestimmt durch die Zeitauflösung des verwendeten Spektrometers und durch die Totzeit des Flußsystems. Diese Totzeit bestimmt den Zeitpunkt der ersten Messung nach der Mischung. Sie wird bestimmt durch den Abstand zwischen Mischkammer und Meßzelle und die verwendete Flußgeschwindigkeit.

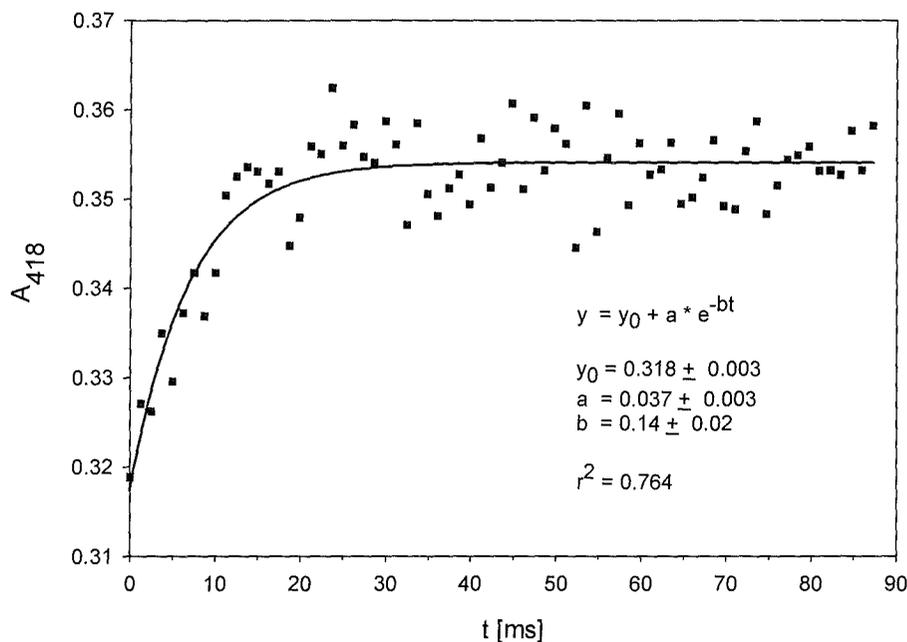


Abbildung 3-13 Bestimmung der Stopzeit des Systems nach dem Einspritzen von 250 mM $K_3[Fe(CN)_6]$. $\lambda_{max}(K_3[Fe(CN)_6]) = 418.4 \text{ nm}$. Exponentieller Fit der Meßdaten.

Dieser Abstand kann jedoch nicht beliebig verkleinert werden, da gewährleistet sein muß, daß nur vollständig vermischte Substanzen in die Meßkammer gelangen. Das zu vermessende Volumenelement muß also noch mit maximaler Flußgeschwindigkeit die Mischkammer passiert haben. Die minimale Strecke ergibt sich also aus der Stopzeit des Systems, gleichbedeutend mit der Zeit, die das Ventil zum Schließen des Kanals benötigt, multipliziert mit der durchschnittlichen Geschwindigkeit des Stromes während des Bremsvorgangs. Vom Hersteller wird die Schaltzeit der Ventile mit 105 ms angegeben. Diese Zeit entspricht dem gesamten Schaltvorgang von der vollständigen Öffnung des einen Kanals bis zur

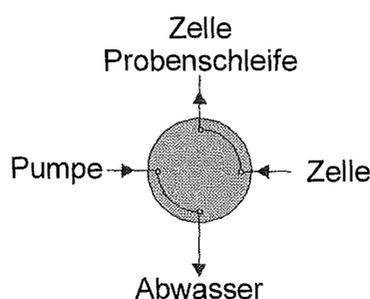
vollständigen Öffnung des anderen Kanals. Das Stopprofil erstreckt sich aber nur über das Zeitintervall, das für das Schließen eines Kanals nötig ist. Diese Zeit wurde daher experimentell bestimmt.

Die Stopzeit entspricht der Zeit, die für den Anstieg des Signals in Abbildung 3-12 benötigt wird. Zur Bestimmung der Stopzeit wurden Messungen im VIS-Bereich mit einer Zeitauflösung von einer Millisekunde durchgeführt. Die Messung wurde kurz vor dem Stoppen des Ventils gestartet und der Anstieg des Signals bei 418.4 nm beobachtet. Anschließend wurde eine Exponentialfunktion an die Meßdaten angepaßt (siehe Abbildung 3-13). Die Bremszeit beträgt ca. 20 ms.

3.3.5 Verbesserungen am Flußsystem

3.3.5.1 Verbesserung der Signalstabilität

Zustand beim Stop, Kurzschluß



Zustand beim Stop, offen

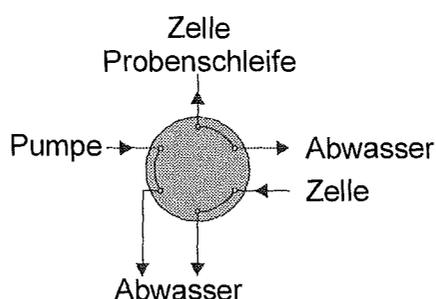


Abbildung 3-14 Modifikation des Flußsystems zur Verbesserung der Signalstabilität. Gezeigt ist das System während der Messung mit Kurzschluß (oben) und mit offener geschalteter Zelle (unten). Der Druck in der Zelle beträgt 10^5 Pa.

Wie oben beschrieben, führt der Kurzschluß zwischen Ein- und Auslaß der Zelle während des Stoppens zu einer Druckzunahme, die sich langsam wieder abbaut. In einer modifizierten

Version des Flußsystems (siehe Abbildung 3-14) werden daher während des Stopvorgangs Zu- und Ablauf der Zelle offen geschaltet. Nach dem Schaltvorgang herrscht daher vor und nach der Zelle ein Druck von 10^5 Pa. Der Überdruck in der Zelle baut sich schnell zu beiden Seiten hin ab. Das Nachlaufen wird immer noch verhindert. Dadurch kommt es zu einer Druckabnahme in der Zelle und zu einer Abnahme der gemessenen Absorptionen (siehe Abbildung 3-15). Diese Abnahme verläuft mit zwei Geschwindigkeitskonstanten. Die Hauptabnahme verläuft sehr schnell, dabei bewegen sich die durch den Druck auseinander geschobenen Fenster wieder in die Ausgangsposition zurück. Danach folgt ein Abfall mit einer kleineren Geschwindigkeitskonstante, vermutlich wird dabei zwischen Spacer und Fenster eingedrungene Lösung wieder verdrängt. Das Signal ist nach ca. 10 Sekunden ausreichend konstant für FTIR-differenzspektroskopische Messungen. Da die Zeitauflösung bei den hier vorgestellten Arbeiten keinen Einfluß hat, wird in der Regel zwischen Stoppen des Flusses und Beginn der Messung eine Wartezeit von 15 Sekunden eingehalten.

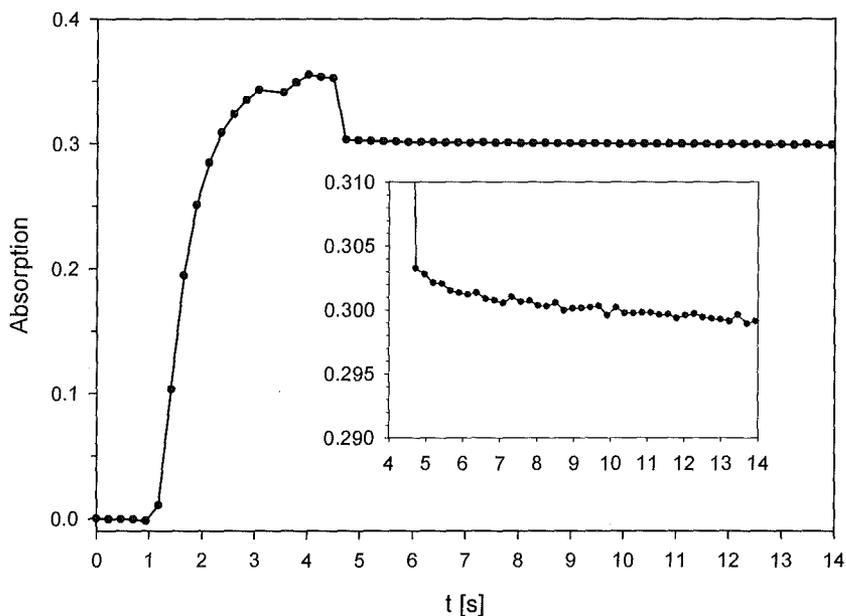


Abbildung 3-15 Abnahme des Signals nach dem Stop bei 4.5 s in dem modifizierten Flußsystem. 0.1 M $K_4[Fe(CN)_6]$ Absorption bei $\tilde{\nu} = 2036 \text{ cm}^{-1}$.

Die Zeit für die Schichtdickenänderung nach dem Schalten kann durch Verkleben der beiden Fenster auf ca. 100 ms reduziert werden (Masuch 1999). Dies ist in dieser Arbeit jedoch nicht nötig, da keine schnellen Kinetiken untersucht werden.

3.3.5.2 Reduktion des Probenverbrauchs

In den verwendeten HPLC-Kapillaren herrschen aufgrund der kleinen Innendurchmesser bei allen verwendeten Flußgeschwindigkeiten laminare Strömungsverhältnisse. Die in laminar durchströmten Systemen herrschenden Bedingungen sind in Kapitel 3.2 beschrieben.

Wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, läßt sich die Dispersion im System durch Verringerung des durchströmten Volumens V_{System} reduzieren. Dies kann entweder durch Reduktion der Länge oder des Innenradius der Kapillaren geschehen. Die Länge der Kapillaren kann allerdings aufgrund der Geometrie der Apparatur nicht beliebig verkürzt werden.

Eine Verkleinerung des Innenradius der Kapillare hat bei gleichbleibendem Volumenstrom einen Anstieg des Druckabfalls in der Kapillare zur Folge. Gleichzeitig wird die laterale Flußgeschwindigkeit v größer, so daß mit geringeren Volumenströmen gearbeitet werden kann.

Wie in Abbildung 3-16 gezeigt, läßt sich die Dispersion durch den Einbau von Kapillaren mit einem Innenradius r_0 von 0.0762 mm (0.003") anstelle des vorher verwendeten Innenradius von 0.254 mm (0.01") deutlich reduzieren. Das Volumen der Zuleitung wird dabei von 65 μl auf 5.1 μl reduziert.

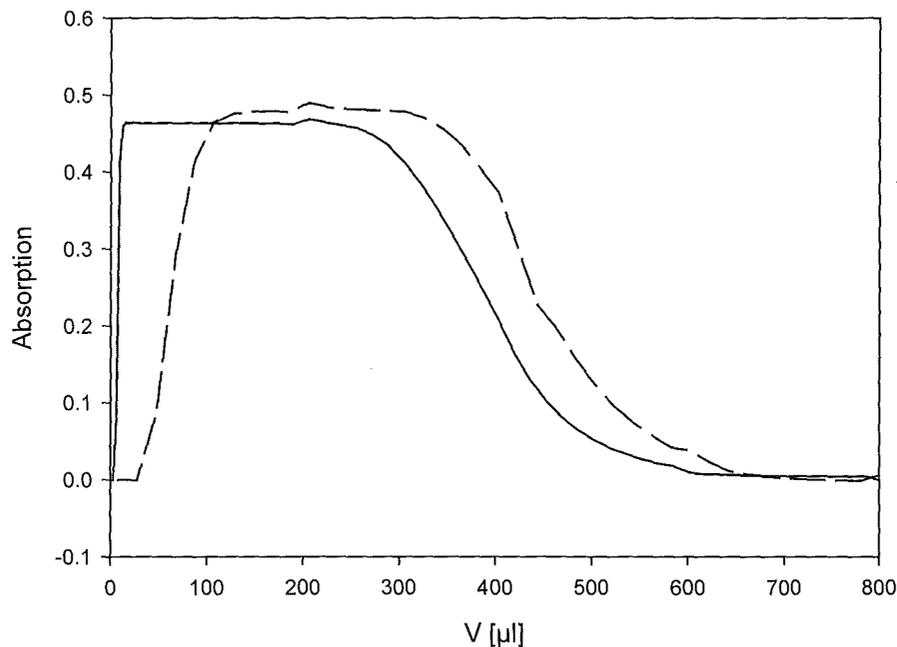


Abbildung 3-16 Reduktion der Dispersion durch Verwendung von Kapillaren mit 0.0762 mm (durchgezogene Linie) anstelle von 0.254 mm Innenradius (gestrichelte Linie) bei einem Probenvolumen von 410 μl . Absorption von 0.1 M $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $\tilde{\nu} = 2039 \text{ cm}^{-1}$.

Man erkennt deutlich, daß der Anstieg im neuen System deutlich steiler ist als im alten System. Die Änderung ist im hinteren Teil der Kurve weniger deutlich, da dort das Volumen V_{System} dem Kapillarovolumen plus dem Probenschleifenvolumen entspricht. Die Reduktion ist also wesentlich geringer. Ein für die Messung ausreichendes Plateau kann in diesem System schon durch ein Probenvolumen von 50 μl erreicht werden (siehe Abbildung 3-17).

Die Länge der Kapillaren ist durch die geometrischen Verhältnisse festgelegt. Durch Einbau des Probenschleifenventils in die Probenkammer des Spektrometers konnte die Länge der Kapillaren von 28 cm auf 12 cm gekürzt werden (Reduktion des Volumens von 5.1 μl auf 2.2 μl), so daß sich der Probenverbrauch auf 20 μl verringert. Sollte eine weitere Reduktion des Probenbedarfs wünschenswert werden, wäre dies durch Positionierung des Ventils direkt an der Zelle durchaus erreichbar. Störungen durch Erschütterungen, die beim Schalten des Ventils entstehen, traten in dieser Arbeit nicht auf. Bei Messungen mit kurzer Zeitauflösung können die auftretenden Störungen durch Lagerung der Ventile auf Gummiplatten verhindert werden (Masuch 1999).

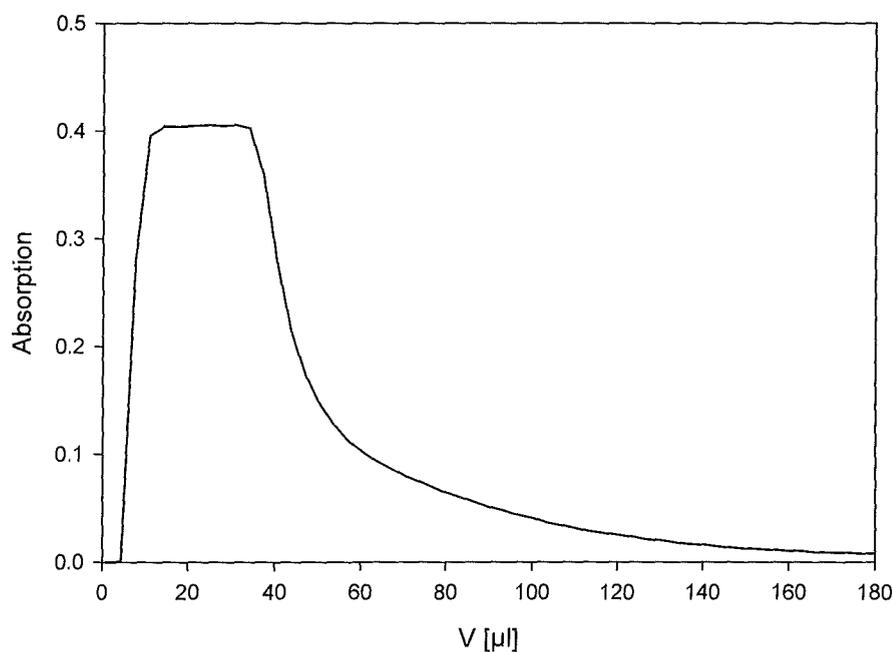


Abbildung 3-17 Strömungsprofil mit einem Probenschleifenvolumen von 50 μl . Absorption von 0.1 M $K_4[Fe(CN)_6]$ $\tilde{\nu} = 2039 \text{ cm}^{-1}$.

3.3.6 Ergebnisse

Wie in diesem Kapitel gezeigt wird, ist es mit dem hier entwickelten Flußsystem möglich, Lösungen schnell und reproduzierbar in eine IR-Meßzelle mit nur 10 μm Schichtdicke zu transportieren. Die Verwendung von Komponenten aus der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) hat sich in Bezug auf die Druckstabilität als geeignet erwiesen. Durch

Verwendung von Probenschleifen läßt sich der Probenverbrauch gegenüber konventionellen Stopped-Flow Systemen deutlich erniedrigen. Der Probenverbrauch der Apparatur kann auf 50 µl, durch Umbau des Spektrometers sogar auf 10 µl verkleinert werden. Das Signal ist nach einer Wartezeit von 10 Sekunden nach dem Stop ausreichend konstant. Bei Anwendungen mit höherer Zeitauflösung müssen, wie in einer Parallelarbeit gezeigt, die Fenster verklebt werden, um die Relaxationszeit zu verkürzen. Die Meßzelle, die in dieser Arbeit verwendet wird, hält Drücken bis zu $3 \cdot 10^6$ Pa und Flußgeschwindigkeiten bis zu 167 µl/s stand.

Nachdem die apparativen Voraussetzungen nun geschaffen sind, werden im folgenden die FTIR-spektroskopischen Untersuchungen am Modellsystem Trypsin vorgestellt.

4 Erprobung des Verfahrens an Trypsin als Modellsystem

Nachdem in den vorangehenden Kapiteln das Flußsystem entwickelt worden ist, mit dem die unterschiedlichen Lösungen in die Meßzelle transportiert werden können, soll nun an einem Modellsystem gezeigt werden, daß die FTIR-Differenzspektroskopie die Unterscheidung zwischen bindenden und nicht-bindenden Substanzen erlaubt und daß die Komplexbildung zwischen Protein und Ligand zu einem charakteristischen Differenzspektrum führt. Dieses Differenzspektrum erlaubt Aussagen über die Art der Bindung, Vergleiche zwischen unterschiedlichen Liganden sowie die Charakterisierung der eventuell durch die Komplexierung ausgelösten Konformationsänderung des Proteins.

Als Modellsystem wird Trypsin gewählt, da dieses Protein leicht verfügbar ist. Außerdem ist aus Röntgenstrukturdaten von Komplexen mit unterschiedlichen Liganden bekannt, daß die Bindung des Liganden keine großen Änderungen der Struktur verursacht. Lassen sich dennoch Unterschiede in der Infrarotabsorption von Protein und Komplex erkennen, so ist klar, daß die Methode empfindlich genug ist, um auch auf andere Proteine übertragen zu werden. Die Autolyse des Trypsins, die zu großen Änderungen der Struktur führt, wird durch die untersuchten Inhibitoren gehemmt. Auf diese Weise lassen sich als Kontrollmöglichkeit große Absorptionsänderungen zwischen gehemmtem und ungehemmtem Trypsin untersuchen. Dadurch ist ein Test möglich, ob die Signale der Komplexbildung zu klein für eine FTIR-differenzspektroskopische Erfassung sind.

Bevor die Ergebnisse der Messungen beschrieben werden, wird im Folgenden auf die biochemischen Eigenschaften des Trypsins und seine Bindung an unterschiedliche Liganden sowie auf den Versuchsaufbau eingegangen.

4.1 Grundlagen

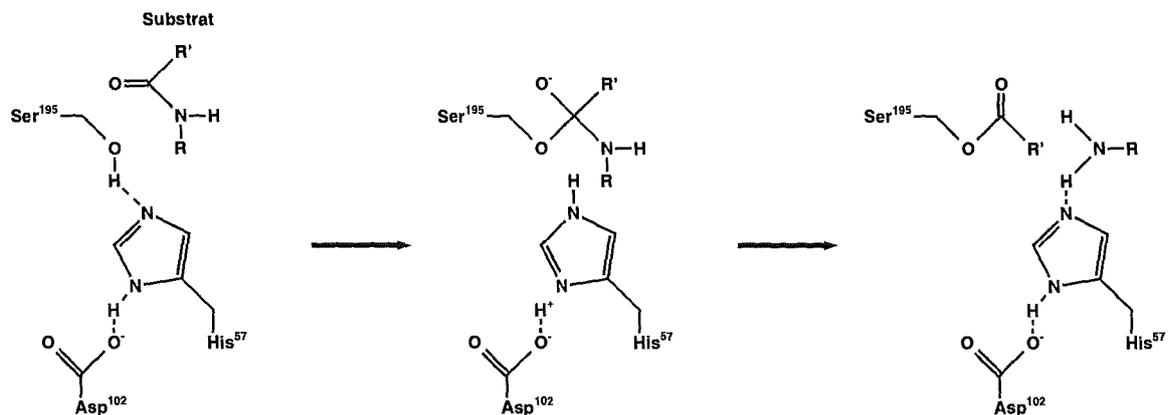
Trypsin gehört zur Gruppe der Proteasen, die eine für die Pharmazie wichtige Gruppe der Proteine darstellen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei Verdauungsprozessen, der Blutgerinnung und der Fibrinolyse. Proteasehemmer werden u.a. bei der Behandlung von HIV-Infektionen und von Thrombosen bzw. Infarkten eingesetzt. Proteasen sind daher eine besonders gut untersuchte Proteinklasse, für die viele spezifische und unspezifische Inhibitoren bekannt sind. Ihre Funktion ist die Spaltung von Peptidbindungen. Nach den im katalytischen Zentrum wirksamen Gruppen unterscheidet man mehrere große Klassen, die Serin-, Aspartat-, Cystein- und die Metalloproteinasen.

Das Verdauungsenzym Trypsin ist ein gut zugängliches Modellprotein für die Klasse der Serinproteasen. Rindertrypsin besteht aus 223 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 23.3 kDa. Aufgrund seines Vorkommens im Dünndarm liegt das Wirkoptimum im leicht

Alkalischen bei $\text{pH} = 7-9$. Es entsteht im Dünndarm aus der im Pankreas produzierten Vorstufe Trypsinogen durch Abspaltung eines N-terminalen Peptids mittels des Enzyms Enterokinase oder autokatalytisch. Weitere wichtige Vertreter der Klasse der Serinproteasen sind Chymotrypsin, ebenfalls ein Verdauungsenzym und Thrombin, das eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung spielt.

Der Mechanismus der Serinproteasen ist in Abbildung 4-1 dargestellt (Stryer 1991). Die katalytische Triade besteht aus His^{57} , Asp^{102} und Ser^{195} (Numerierung analog zu Chymotrypsin (Bode et al. 1989)). Die Hydrolyse der Ester- bzw. Amidsubstrate läuft dabei über ein Enzymintermediat, bei dem die Hydroxylgruppe des Ser^{195} acyliert ist. Das tetraederische Intermediat entspricht formal einem Aminoketal. Solche Ketale sind instabil und stabilisieren sich durch Verlust der Aminogruppe (March 1992). Das Imidazolsystem des His^{57} wirkt dabei als Protonenakzeptor. Durch das Vorhandensein des Asp^{102} wird der pK_a des Histidins angehoben und gleichzeitig dessen Position fixiert (Fersht 1985).

Acylierung



Deacylierung

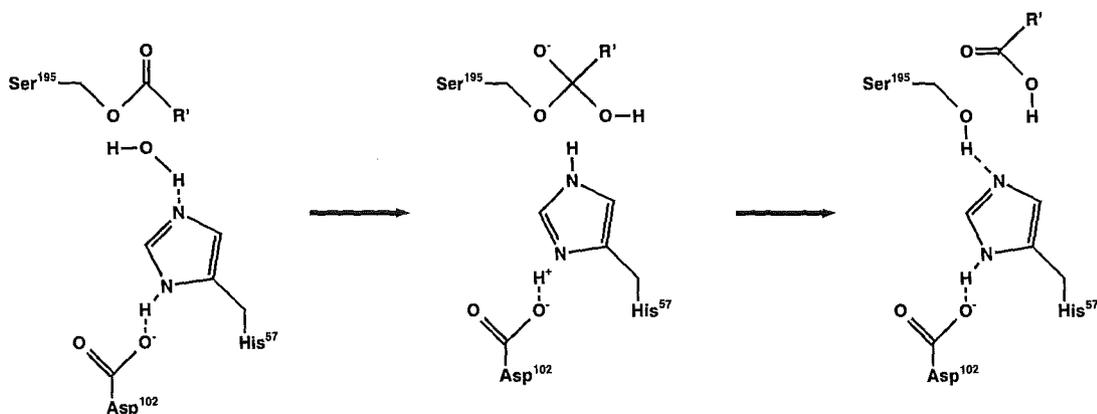


Abbildung 4-1 Katalytischer Mechanismus der Serinproteasen.

Die Substratspezifität der Serinproteasen ist abhängig von der Aminosäuresequenz der unterschiedlichen Enzymuntereinheiten, die für die Substraterkennung zuständig sind. Die

Nomenklatur dieser Untereinheiten ist in Abbildung 4-2 dargestellt. Die Untereinheiten der Protease werden mit S, diejenigen des Substrats mit P bezeichnet. Ausgehend von der Schnittstelle werden die Aminosäurereste des Substrats auf der N-terminalen Seite mit P1, P2, P3..., die auf der C-terminalen Seite mit P1', P2', P3'... bezeichnet. Die Reste, zwischen denen die Spaltung erfolgt, sind also P1 und P1'. Die komplementären Untereinheiten der Protease werden mit ... S3, S2, S1, S1', S2', S3'... numeriert.

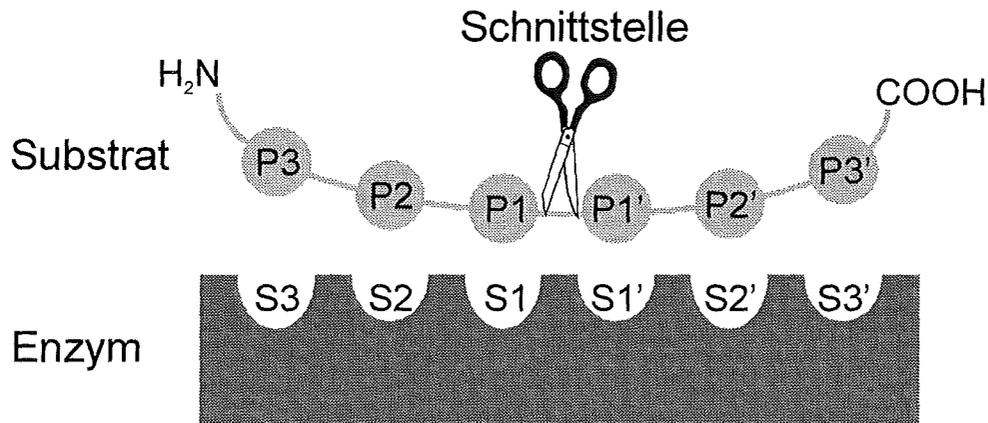


Abbildung 4-2 Nomenklatur der Proteaseuntereinheiten nach Schechter und Berger (Schechter u. Berger 1967)

Einige Enzyme haben eine ausgedehnte Bindungstasche, während bei anderen die Spezifität nur durch die S1 Bindestelle bestimmt wird (Moreau u. Choplin 1990).

Trypsin und Thrombin haben eine ähnliche Spezifität. Beide schneiden nach den basischen Aminosäuren Arg und Lys, wobei Trypsin die breitere Substratspezifität besitzt. Für diese Spezifität ist hauptsächlich die Aminosäure Asp¹⁸⁹ in der S1-Tasche verantwortlich. Chymotrypsin spaltet nach den hydrophoben Resten Phe, Tyr und Trp.

4.2 Untersuchte Liganden und deren Bindung an Trypsin

Die in Abbildung 4-3 gezeigten Liganden werden untersucht. Leupeptin ist ein mikrobieller Hemmstoff für Trypsin und Trypsin ähnliche Proteasen (Umezawa 1977; Umezawa 1982; Umezawa 1982). Inhibitoren mit einer Aldehydgruppe sind vielversprechende Leitstrukturen für Proteaseinhibitoren z. B. zur Krebsbekämpfung. Durch ihren Metabolismus kommt es aufgrund des peptidischen Charakters nicht zur Bildung toxischer Produkte. Allerdings sind sie chemisch instabil und zerfallen in Lösung, da die Aldehydgruppe leicht zur chemisch inaktiven Carboxylgruppe oxidiert wird. Bei Propionyl-Leupeptin handelt es sich um ein chemisch modifiziertes Derivat. Die Propionylgruppe verhindert die Hemmung nicht.

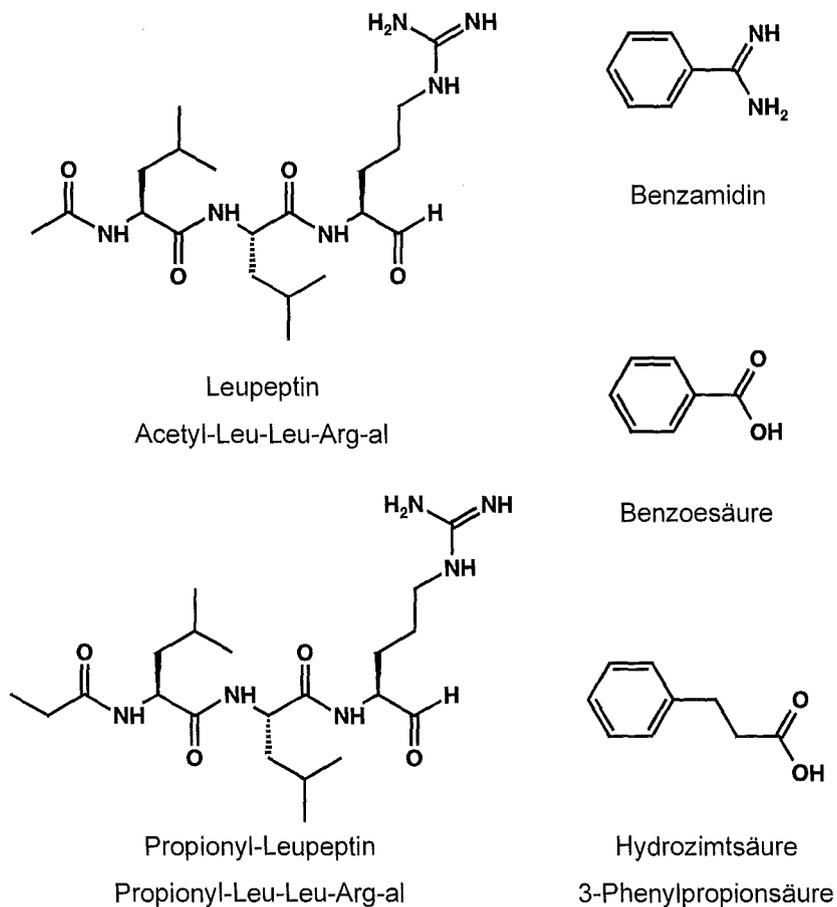


Abbildung 4-3 Chemische Formel und Namen aller untersuchten Trypsin-Liganden. Dabei binden Leupeptin, Propionyl-Leupeptin und Benzamidin an Trypsin. Hydrozimsäure und Benzoessäure binden nicht.

Benzamidin imitiert die Guanidinogruppe des Arginins mit seiner Amidinogruppe und bindet daher ebenfalls an Trypsin (Babine u. Bender 1997). Durch den Austausch der Amidinogruppe mit einer Säuregruppe in Benzamidin erhält man Benzoessäure. Dabei geht die Fähigkeit, an Trypsin zu binden, verloren. Die Hydrozimsäure ist ein Chymotrypsin-Inhibitor (Neurath u. Schwert 1950), der an Trypsin nicht bindet. Bei der Bindung von Hydrozimsäure an Chymotrypsin besetzt der Phenylring die hydrophobe S1-Bindungstasche.

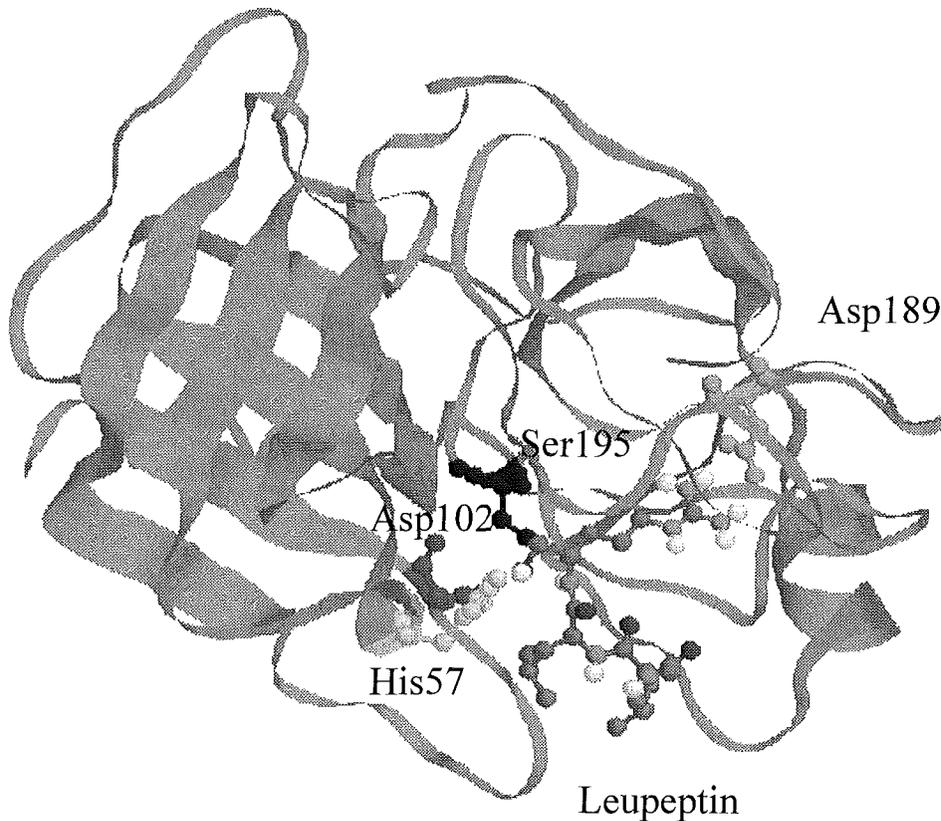


Abbildung 4-4 Kristallstruktur des Trypsin-Leupeptin-Komplexes (Kurinov u. Harrison 1996). Die Aminosäurereste des aktiven Zentrums Ser¹⁹⁵, Asp¹⁰² und His⁵⁷ sowie der für die Substratspezifität verantwortliche Rest Asp¹⁸⁹ und der Ligand Leupeptin sind hervorgehoben.

In Abbildung 4-4 ist die Kristallstruktur des Komplexes aus Trypsin und Leupeptin (Kurinov u. Harrison 1996) gezeigt. Bei der Bildung dieses Komplexes handelt es sich um einen zweistufigen Prozeß. Zuerst wird Leupeptin schwach an Trypsin gebunden. Anschließend bildet die Aldehydgruppe des Leupeptins ein Halbacetal mit der Hydroxylgruppe des Ser¹⁹⁵. Das so erhaltene Halbacetal entspricht dem Aminoketal des tetraedrischen Übergangszustands. In der Röntgenstruktur des Trypsin-Leupeptin-Komplexes ist zwischen dem Aldehyd und der Hydroxylgruppe des Ser¹⁹⁵ deutlich Elektronendichte zu erkennen. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf das Vorliegen einer kovalenten Bindung. Diese ist jedoch vollkommen reversibel, so daß sich Leupeptin trotzdem wie ein starker, reversibler, kompetitiver Inhibitor verhält. Die Spezifität Trypsins gegenüber basischen Aminosäureresten wird durch Asp¹⁸⁹ in der S1-Bindestelle bestimmt. Die Guanidinogruppe des Argininrestes von Leupeptin bildet eine Salzbrücke mit Asp¹⁸⁹ und mehrere Wasserstoffbrücken mit Aminosäuren der Bindungstasche. Das Peptidrückgrat des Leupeptins bildet ein β -Faltblatt mit den Aminosäuren Ser²¹⁴-Gly²¹⁶ des Trypsins. Die Leucin-Seitenketten weisen in Richtung des Lösungsmittels. Die S2- und S3-Bindestellen scheinen daher schlecht definiert zu sein. Schwache hydrophobe Kontakte mit Trypsinresten sind jedoch wahrscheinlich. Die Leucin-Seitenketten sind in der Struktur fehlgeordnet, dies deutet auf eine weitgehend freie Rotation

um die C_β-C_γ-Bindung sogar im Kristall hin. Der Sauerstoff der Hydroxygruppe des Hemiacetals bildet eine starke Wasserstoffbrücke mit His⁵⁷. NMR-Untersuchungen haben jedoch ergeben, daß in Lösung zwei Konformationen des Acetals vorliegen (Ortiz et al. 1991). Das Hauptkonformer bei pH > 5 entspricht der S-Konfiguration um den Kohlenstoff des Hemiacetals. Dabei zeigt das Sauerstoffatom des Hemiacetals in Richtung des Oxyanion-Loches und ist wasserstoffverbrückt mit den Rückgratamiden von Gly¹⁹³ und Ser¹⁹⁵. Das R-Konformer, beim dem analog zur Röntgenstruktur eine Wasserstoffbrücke mit His⁵⁷ gebildet wird, ist bei niedrigem pH-Wert bevorzugt.

In der Kristallstruktur des Benzamidin-Komplexes (Bode u. Schwager 1975a; Marquart et al. 1983) ist die Amidinogruppe des Benzamidins symmetrisch über zwei Wasserstoffbrücken an das Carboxylat des Asp¹⁸⁹ gebunden. Zusätzliche Wechselwirkungen gibt es zum Seitenkettensauerstoff des Ser¹⁹⁰, dem Rückgratcarbonyl des Gly²¹⁹ sowie einem Wassermolekül. Benzamidin besetzt also ausschließlich die S1-Bindungsstelle. Die Amidinogruppe alleine ist für die kleine Dissoziationskonstante K_i des Komplexes verantwortlich.

4.3 Methode zur Aufnahme der Differenzspektren

Nach der Beschreibung der biochemischen und biophysikalischen Grundlagen soll nun auf die mit dem Modellsystem durchgeführten Messungen eingegangen werden.

Für diese Versuche wurde das in Kapitel 3.3.4.1 Abbildung 3-10 beschriebene Flußsystem verwendet. Die Spektren wurden mittels des Verfahrens der statischen Differenzbildung aufgenommen. Dabei werden FTIR-Spektren mit der Protein-Ligand-Mischung als Probe und dem Protein als Referenz sowie mit dem Liganden als Probe und Puffer als Referenz aufgenommen (siehe Abbildung 4-5). Dazu werden die Lösungen abwechselnd über das Flußsystem in die Zelle gepumpt und jeweils die Einstrahlspektren gemessen. Die Absorption wird wie in Gleichung 4-1 beschrieben berechnet.

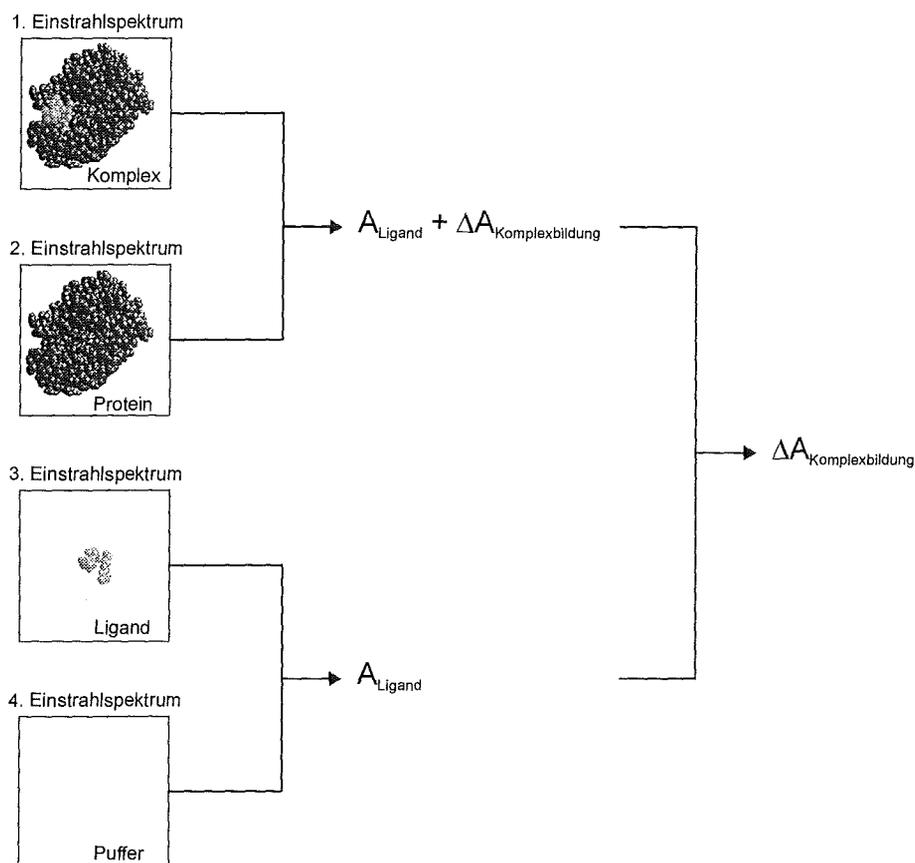


Abbildung 4-5 Verfahren der statischen Differenzbildung für die Versuche zur differenzspektroskopischen Untersuchung von Protein-Ligand-Komplexen am Beispiel von Trypsin.

$$\Delta A_{\text{Komplexbildung}} + A_{\text{Ligand}} = \log \frac{I_{\text{Protein+Ligand}}}{I_{\text{Protein}}}$$

$$A_{\text{Ligand}} = \log \frac{I_{\text{Ligand}}}{I_{\text{Puffer}}}$$

$$\Delta A_{\text{Komplexbildung}} = (\Delta A_{\text{Komplexbildung}} + A_{\text{Ligand}}) - A_{\text{Ligand}}$$

Gleichung 4-1 Berechnung der Differenzspektren.

Das so erhaltene Spektrum $\Delta A_{\text{Komplexbildung}} + A_{\text{Ligand}}$ enthält sowohl die Banden des Liganden als auch Banden, die durch die Wechselwirkungen hervorgerufen werden. Das Spektrum A_{Ligand} enthält alle Absorptionsbanden des Liganden. Ein Vergleich der beiden Spektren erlaubt Aussagen über das Vorliegen einer Komplexbildung. Sind die beiden Spektren $\Delta A_{\text{Komplexbildung}} + A_{\text{Ligand}}$ und A_{Ligand} identisch, hat keine Reaktion zwischen Protein und Ligand stattgefunden. Eine Wechselwirkung führt zu Unterschieden zwischen den beiden Spektren. Die Wechselwirkungsbanden erhält man durch Subtraktion der beiden Spektren als sogenanntes Differenzspektrum.

Um die entsprechenden Spektren aufzunehmen, wird eine Lösung des Proteins ($c = 2 \text{ mM}$) hergestellt und geteilt. Zu einer Hälfte der Proteinlösung wird eine hoch konzentrierte Lösung des Liganden in Puffer bzw. DMSO/Puffer hinzu pipettiert, so daß die Endkonzentration des Liganden ebenfalls bei ca. 2 mM liegt. Die andere Hälfte wird mit der entsprechenden Menge reinen Lösungsmittels verdünnt. Analog wird eine Lösung des Liganden in Puffer bzw. einer Pufferlösung mit geringem DMSO-Anteil hergestellt.

Typischerweise werden $10 \mu\text{l}$ einer 0.2 M Stammlösung des Liganden in $1000 \mu\text{l}$ Proteinlösung pipettiert. Aufgrund der Zugabe des Liganden als konzentrierte Stammlösung werden die Fehler in der Konzentration des Proteins minimiert (siehe Gleichung 4-2). Dies ist notwendig, da das Spektrum $[\text{Protein} + \text{Ligand}] - [\text{Protein}]$ im Fall einer nicht-bindenden Substanz nicht nur die Banden des Liganden, sondern auch durch eventuelle Konzentrationsfehler hervorgerufene Beiträge des Absorptionsspektrums des Proteins enthält. Dieser Beitrag muß für einen akkuraten Vergleich mit dem reinen Spektrum des Liganden minimal sein. Der mit dieser Methode erzielbare durchschnittliche Fehler in der Proteinkonzentration ist ausreichend, um den Anteil der Proteinbanden an dem Spektrum $[\text{Protein} + \text{Ligand}] - [\text{Protein}]$ zu vernachlässigen.

Präzision der Pipetten	$1000 \mu\text{l} \pm 2 \mu\text{l}$	$10 \mu\text{l} \pm 0.1 \mu\text{l}$
Extreme der Proteinkonzentration	$\frac{998}{998+10.1} = 0.98998$ Minimum	$\frac{1002}{1002+9.9} = 0.99022$ Maximum
Durchschnittliche Proteinkonzentration	$\frac{1000}{1000+10} = 0.99010 \pm 0.01188\%$	

Gleichung 4-2 Berechnung des durchschnittlichen Fehlers des Verdünnungsfaktors für die Proteinlösung. Präzisionsangaben der Pipetten nach (Eppendorf 1999).

Schon kleine Pipettierfehler führen zu relativ großen Fehlern bei der Ligandkonzentration (Verdünnungsfaktor für den Liganden: $9.9010 \cdot 10^{-3} \pm 1.19\%$). Bei Verwendung von Wasser/DMSO-Gemischen als Lösungsmittel, sind die Fehler bei den DMSO Banden aufgrund deren großer Absorption besonders deutlich. Dieser Konzentrationsfehler läßt sich durch eine Skalierung des gemessenen Spektrums einfach korrigieren.

Falls sich die beiden Spektren $[\text{Protein} + \text{Ligand}] - [\text{Protein}]$ und $[\text{Ligand}]$ nur durch einen Skalierungsfaktor und eine Basislinienverschiebung unterscheiden, können die Konzentrationsfehler mathematisch korrigiert werden. Die Korrektur wird für den allgemeinen Fall von zwei Spektren S1 und S2 im Folgenden beschrieben.

Wenn die Unterschiede zwischen den beiden Spektren S1 und S2 alleine durch einen Skalierungsfaktor (Konzentrationsfehler) a und eine parallele Basislinienverschiebung b erklärt werden können, dann kann eine einfache lineare Korrektur mit der einfachen, linearen

Gleichung 4-3 durchgeführt werden. Die Ähnlichkeit zwischen S1 und S2_{korrr} muß danach offensichtlich sein.

$$S2_{korrr} = a \cdot S2 + b$$

Gleichung 4-3 Berechnung der lineare Korrektur S2_{korrr} aus S2 mit dem Skalierungsfaktor a und der parallelen Basislinienverschiebung b.

Die Parameter a und b müssen aus den Meßdaten bestimmt werden. Dazu werden die einzelnen Absorptionswerte der Spektren S1 und S2 als ein Satz unabhängiger Messungen betrachtet und deren Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Unter der oben genannten Annahme gilt (mit experimenteller Genauigkeit) für die Mittelwerte \bar{x}_{S1} und $\bar{x}_{S2_{korrr}}$ sowie die Standardabweichungen σ_{S1} und $\sigma_{S2_{korrr}}$, daß $\bar{x}_{S1} = \bar{x}_{S2_{korrr}}$ und $\sigma_{S1} = \sigma_{S2_{korrr}}$. Außerdem gilt, daß $\bar{x}_{S2_{korrr}} = a \cdot \bar{x}_{S2} + b$ sowie $\sigma_{S2_{korrr}} = a \cdot \sigma_{S2}$.

Setzt man \bar{x}_{S1} und σ_{S1} als Schätzwerte für $\bar{x}_{S2_{korrr}}$ und $\sigma_{S2_{korrr}}$ ein, so kann man die oben genannten Simultangleichungen lösen, um die Werte a und b zu erhalten. Das heißt, man normalisiert die Spektren S1 und S2 auf einheitlichen Mittelwert und Standardabweichung. Wenn sich beide Spektren tatsächlich nur in Skalierung und Offset unterscheiden, werden sie dadurch bis zur experimentellen Genauigkeit identisch. Existieren dagegen tatsächliche Unterschiede in Vorhandensein, Lage und relativer Amplitude einzelner Banden, können beide Spektren nicht durch die einfache, lineare Korrektur $ax + b$ identisch werden. Das Spektrum S2_{korrr} ist dann zwar willkürlich skaliert, unterscheidet sich aber immer noch deutlich von S1.

Zur Berechnung des Differenzspektrums wird das Spektrum S2 des Liganden mit der oben angegebenen Methode skaliert und S2_{korrr} von dem Spektrum Komplex gegen Protein S1 abgezogen.

4.4 Stabilisierung von Trypsin gegen Autolyse

Um Differenzspektren ohne Artefakte messen zu können, muß die Proteinlösung bei der erforderlichen hohen Konzentration während des Zeitraums der Messung stabil sein. Eine wichtige Ursache der Instabilität von Trypsin ist die Autolyse.

Die Protease Trypsin, deren Hauptaufgabe die Spaltung von beliebigen Proteinen ist, greift auch andere Trypsin Moleküle an. Diesen Vorgang bezeichnet man als Autolyse. Trypsin besitzt 14 Lysin- und 2 Argininreste, die als Angriffspunkte für die Autolyse dienen können. Dabei kann eine Spaltung in bis zu 16 Peptide erfolgen. In einer detaillierten Untersuchung wurden zwölf dieser Peptide zusammen mit weiteren Spaltstücken gefunden (Vestling et al. 1990). Durch die Spaltung des Trypsinogens zwischen Lys¹⁵ und Ile¹⁶ erhält man β -Trypsin

(Várallyay et al. 1998). Durch Spaltung zwischen Lys¹⁴⁵-Ser¹⁴⁶ im sogenannten Autolyse-loop erhält man aktives α -Trypsin. Ein Schema der schrittweisen Autolyse von Trypsin ist in Abbildung 4-6 gezeigt.

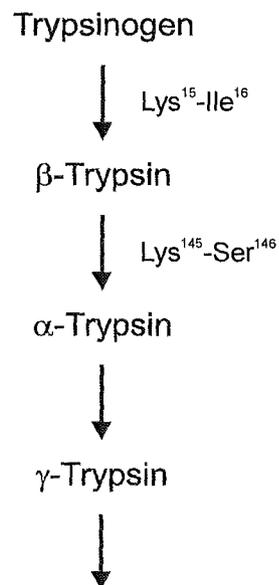


Abbildung 4-6 Stufen der Autolyse von Rindertrypsin (Prestrelski et al. 1991).

FTIR-Untersuchungen der Amid I Bande von Trypsin (Prestrelski et al. 1991) in unterschiedlichen Stadien der Autolyse ergaben eine Abnahme der Intensität bei 1655 cm⁻¹ bei gleichzeitiger Zunahme der Intensität bei 1645 cm⁻¹ für den Übergang zwischen β - und α -Trypsin in D₂O. Außerdem entstehen zwei Banden bei 1691 und 1696 cm⁻¹.

Vergleicht man das Differenzspektrum, das durch Aufnahme der Differenz zwischen Trypsin und dem Leupeptin-Trypsin-Komplex in Phosphat-Puffer entsteht, mit der spontanen Absorptionsänderung einer ungehemmten Trypsin-Lösung über eine Inkubationszeit von 10 Minuten, so ähneln sich diese Spektren auffallend (siehe Abbildung 4-7). Es läßt sich deutlich erkennen, daß Leupeptin die Autolyse des Trypsins hemmt. Dies zeigt, daß die Reaktion zwischen Trypsin und dem Inhibitor bei den verwendeten Versuchsbindungen stattfindet.

Die Spektren zeigen eine deutliche Abnahme der Absorption bei 1636 cm⁻¹ sowie eine Zunahme im Amid I Bereich bei 1697, 1672, 1650 cm⁻¹ sowie bei 1583 und 1398 cm⁻¹. Aufgrund der unterschiedlichen Bandenlage in D₂O und H₂O ist ein Vergleich mit den Daten von Prestrelski et al. (Prestrelski et al. 1991) schwierig.

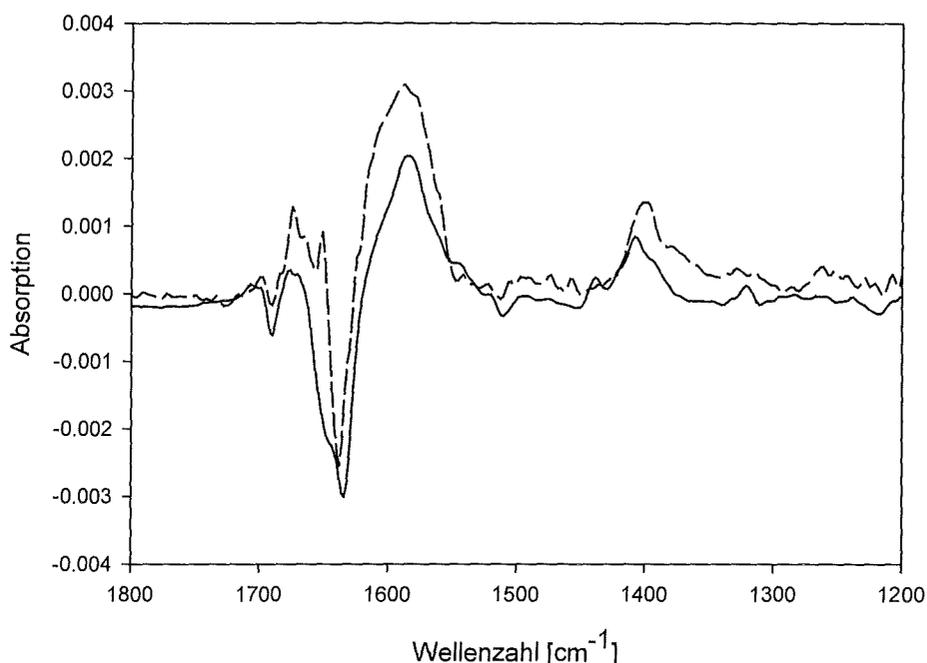


Abbildung 4-7 Vergleich des statischen Differenzspektrums zwischen Trypsin und seinem Komplex mit Leupeptin (durchgezogene Linie) und der spontanen Absorptionsänderung einer ungehemmten Trypsin-Lösung über 10 Minuten Inkubation (gestrichelte Linie).

Um die Absorptionsänderungen durch die Komplexbildung untersuchen zu können, muß die Autolyse auch in der ungehemmten Lösung so weit unterdrückt werden, daß die verbleibenden Autolysebanden kleiner sind als die Komplexbildungsbanden.

Die Autolyse läßt sich durch Zusatz von Calciumchlorid deutlich verlangsamen. Die mittels Röntgenstrukturuntersuchungen gefundene Bindungsstelle für Calcium liegt im Bereich des Loops zwischen den Aminosäuren 68-80 (Bode u. Schwager 1975b). Das Calciumion ist dort fast oktaedrisch von sechs Liganden umgeben. Zwei vicinale Liganden sind die Carbonylsauerstoffe von Asn⁷² und Val⁷⁵. Zwei gegenüberliegende Koordinationsstellen sind von Wassermolekülen besetzt. Die beiden übrigen Koordinationsstellen sind die Seitenketten der Aminosäuren 70 und 80, die beide Glutaminsäuren (SWISS-PROT 1997) und für die Kompensation der Ladung des Ca²⁺-Ions zuständig sind.

Der genaue Mechanismus dieser Hemmung ist nicht bekannt. Vermutungen, daß die Ca²⁺-Bindung die Konformation des Autolyse-Loops ändert, so daß die erste Spaltung verhindert wird, konnten mittels FTIR-spektroskopischer Untersuchungen nicht bestätigt werden (Buono et al. 1994). Der Zusatz eines Inhibitors reduziert den Autolysegrad durch Hemmung des angreifenden Trypsinmoleküls ebenfalls deutlich.

Vergleicht man den Verlauf der Absorption bei 1583 cm⁻¹, dem Maximum einer Bande in Abbildung 4-7, über die Zeit bei einer nicht stabilisierten Probe mit dem Verlauf in je einer

Probe mit Zusatz von Benzamidin als Inhibitor bzw. einer Probe in TRIS-Puffer mit Calciumchlorid, so erkennt man deutlich die Stabilisierung (siehe Abbildung 4-8). Für die anderen Banden aus Abbildung 4-7 erhält man das gleiche Ergebnis. Alle weiteren Versuche fanden daher in 100 mM TRIS-Puffer mit 100 mM Ca^{2+} statt. Trotz des komplizierten Mechanismus der Autolyse und der erwarteten Kinetik zweiter Ordnung lassen sich die experimentellen Daten durch einfache Exponentialfunktionen beschreiben.

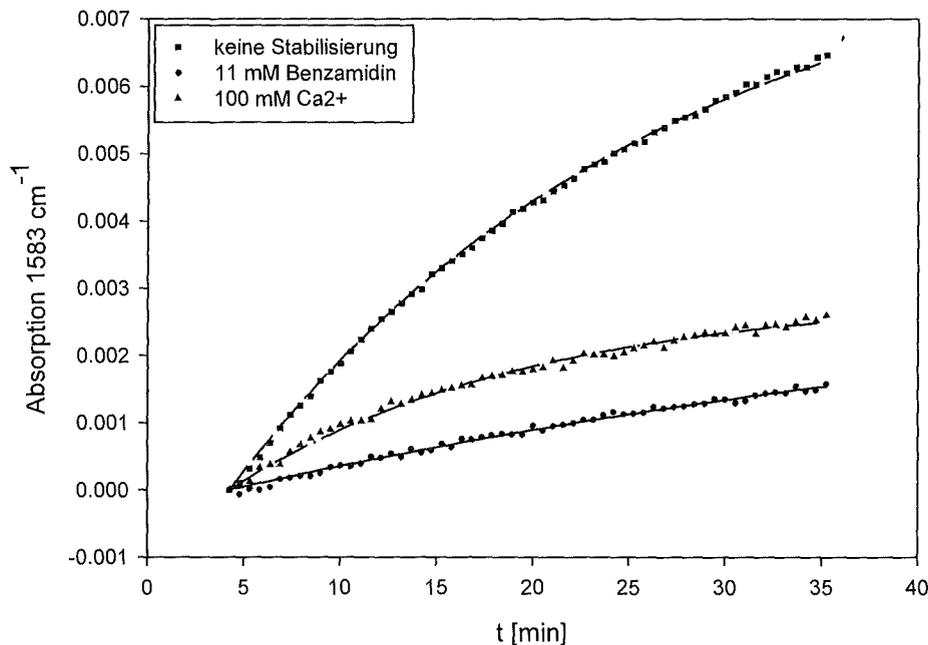


Abbildung 4-8 Stabilisierung von Trypsin gegen Autolyse gezeigt am Verlauf der Absorption bei 1583 cm^{-1} (Maximum einer Bande in Abbildung 4-7). Die Stabilisierung wurde erreicht durch Zugabe von 11 mM Benzamidin bzw. 100 mM Ca^{2+} .

4.5 Untersuchungen an Trypsin-Komplexen

Im Folgenden werden nun die Differenzspektren der Komplexbildung von Trypsin mit unterschiedlichen chemischen Substanzen gezeigt und diskutiert. Die Differenzspektren des Trypsin mit den bindenden Liganden sollten deutliche Banden aufweisen, während die Spektren mit den nicht-bindenden Kontrollsubstanzen Basislinien entsprechen sollen.

4.5.1 Benzamidin

Die genaue Vorgehensweise der statischen Differenzbildung (siehe Abbildung 4-5) soll am Beispiel des Trypsin-Benzamidin-Komplexes dargestellt werden. Alle zur Berechnung des Differenzspektrums verwendeten Spektren sowie eine Basislinie sind in Abbildung 4-9 gezeigt.

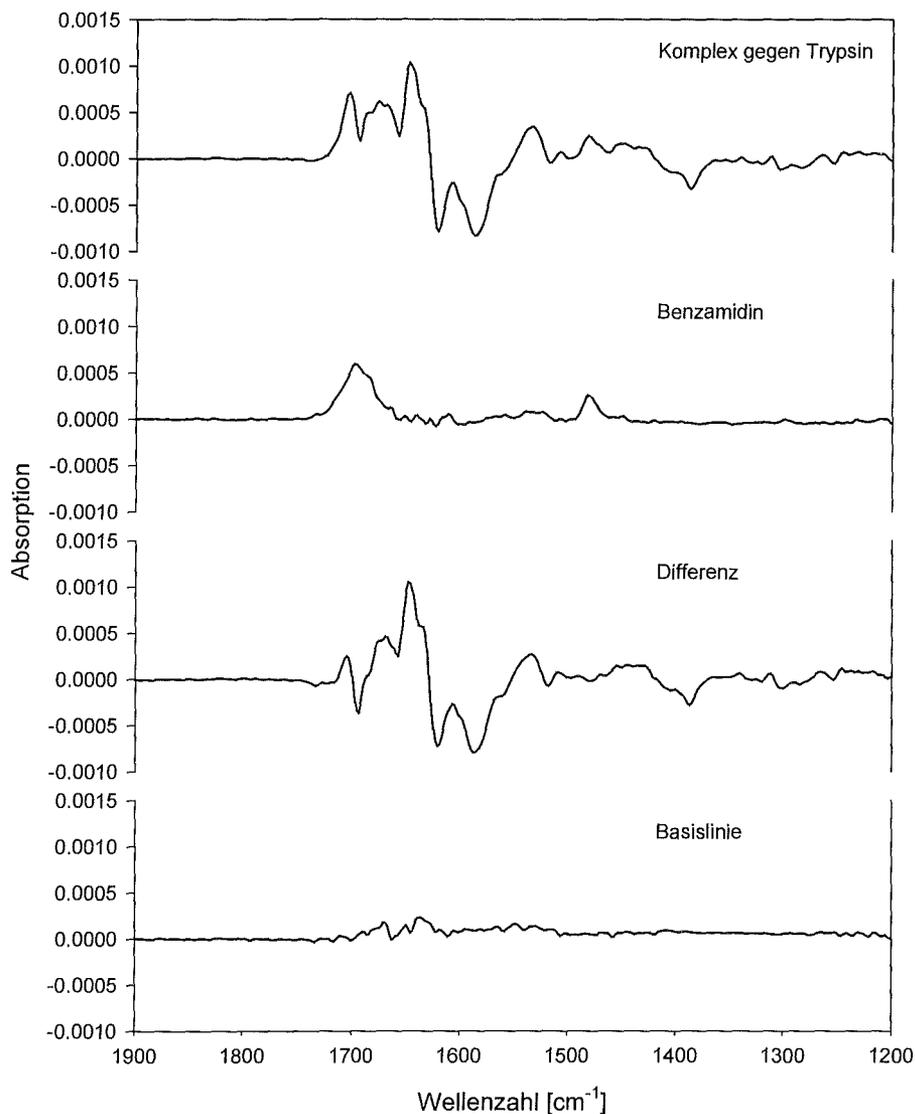


Abbildung 4-9 Darstellung aller für die Berechnung des Benzamidin-Differenzspektrums verwendeten Spektren und der Basislinie (Trypsin gegen Trypsin).

Das oberste Spektrum der Abbildung 4-9 entspricht der Absorptionsänderung zwischen dem Komplex als Probe und reinem Protein als Referenz. Das zweite dargestellte Spektrum ist das Spektrum des Liganden Benzamidin. Man erkennt deutlich, daß sich das Spektrum Komplex gegen Protein von dem Spektrum des Benzamidins unterscheidet. Aus dem Spektrum [Protein + Ligand] - [Protein], das sowohl das Spektrum des Liganden als auch die durch die Wechselwirkung hervorgerufenen Banden enthält, erhält man durch Subtraktion des Ligandspektrums ein Differenzspektrum (Abbildung 4-9, Reihe 3). Bei der Bildung des Differenzspektrums fallen die Signale des Liganden wie z. B. das Signal bei 1489 cm⁻¹ heraus. Das Spektrum enthält nur noch Banden, die durch die Komplexbildung hervorgerufen werden. Um die Größe der Signale im Vergleich mit der Basislinie beurteilen zu können, ist in Abbildung 4-9 unten noch das Spektrum Trypsin gegen Trypsin als Basislinie dargestellt.

Das positive Signal bei 1705 cm^{-1} und das negative Signal bei 1693 cm^{-1} entstehen durch die Verschiebung der antisymmetrischen NCN-Streckschwingung des Benzamidins (Buono et al. 1994).

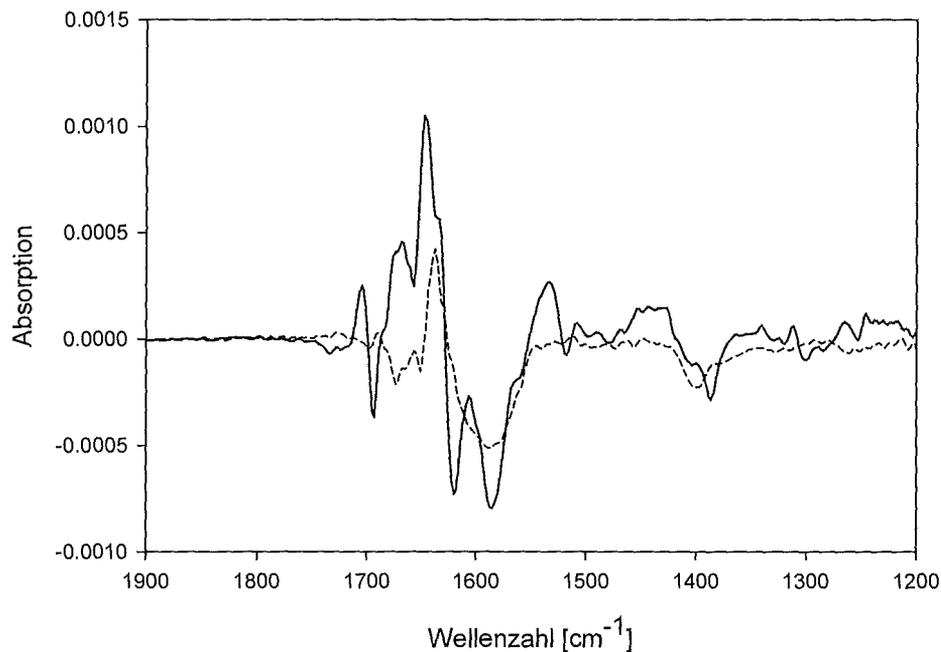


Abbildung 4-10 Vergleich des Differenzspektrums der Komplexbildung von Trypsin mit Benzamidin (durchgezogene Linie) mit dem Differenzspektrum der Autolyse des Trypsins (gestrichelte Linie). Dieses wurde willkürlich skaliert, um vergleichbare Banden hervorzuheben.

Ein Vergleich des Differenzspektrums der Komplexbildung mit dem Autolysespektrum ist in Abbildung 4-10 gezeigt. Die Autolysesignale sind gegenüber den Versuchen mit Phosphat-Puffer als Lösungsmittel (siehe Abbildung 4-7) durch die Zugabe von Ca^{2+} deutlich abgeschwächt. Allerdings scheint im Bereich $1625\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$ noch eine breite Bande unter den Einzelbanden zu liegen. Diese breite Bande ist durch den Unterschied im Autolysegrad zwischen der gehemmten und der ungehemmten Lösung bedingt. Die Autolyse wird durch die Komplexbildung verlangsamt, da Benzamidin als kompetitiver Inhibitor wirkt. Das Gleiche gilt für die Schulter bei 1637 cm^{-1} und die breite Bande bei 1400 cm^{-1} , die unter dem Signal bei 1383 cm^{-1} liegt.

Alle weiteren Banden scheinen durch die Komplexbildung induzierte Absorptionsänderungen des Proteins zu sein. Sie werden daher erst nach Vorstellung aller Spektren besprochen.

Da durch die Komplexbindung deutliche Änderungen der Absorption bedingt sind, läßt sich das Vorliegen einer Komplexbildung mittels der FTIR-Spektroskopie eindeutig nachweisen. Das Spektrum spiegelt Art, Ort sowie den molekularen Mechanismus der Wechselwirkung

wider. Außerdem zeigen die hier vorgestellten Daten, daß der differenzspektroskopische Vergleich zweier verschiedener Lösungen mit einer zur licht- bzw. redoxinduzierten Spektroskopie vergleichbaren Präzision möglich ist. Dies wurde in der Literatur bisher angezweifelt (Mäntele 1993).

4.5.2 Benzoessäure und Hydrozimsäure

Als Kontrollsubstanzen wurden die nicht bindenden Substanzen Benzoessäure und Hydrozimsäure verwendet. In diesen Fällen sollten die Differenzspektren einer Basislinie entsprechen. Alle zur Berechnung des Differenzspektrums von Trypsin mit Benzoessäure verwendeten Spektren sind in Abbildung 4-11 dargestellt.

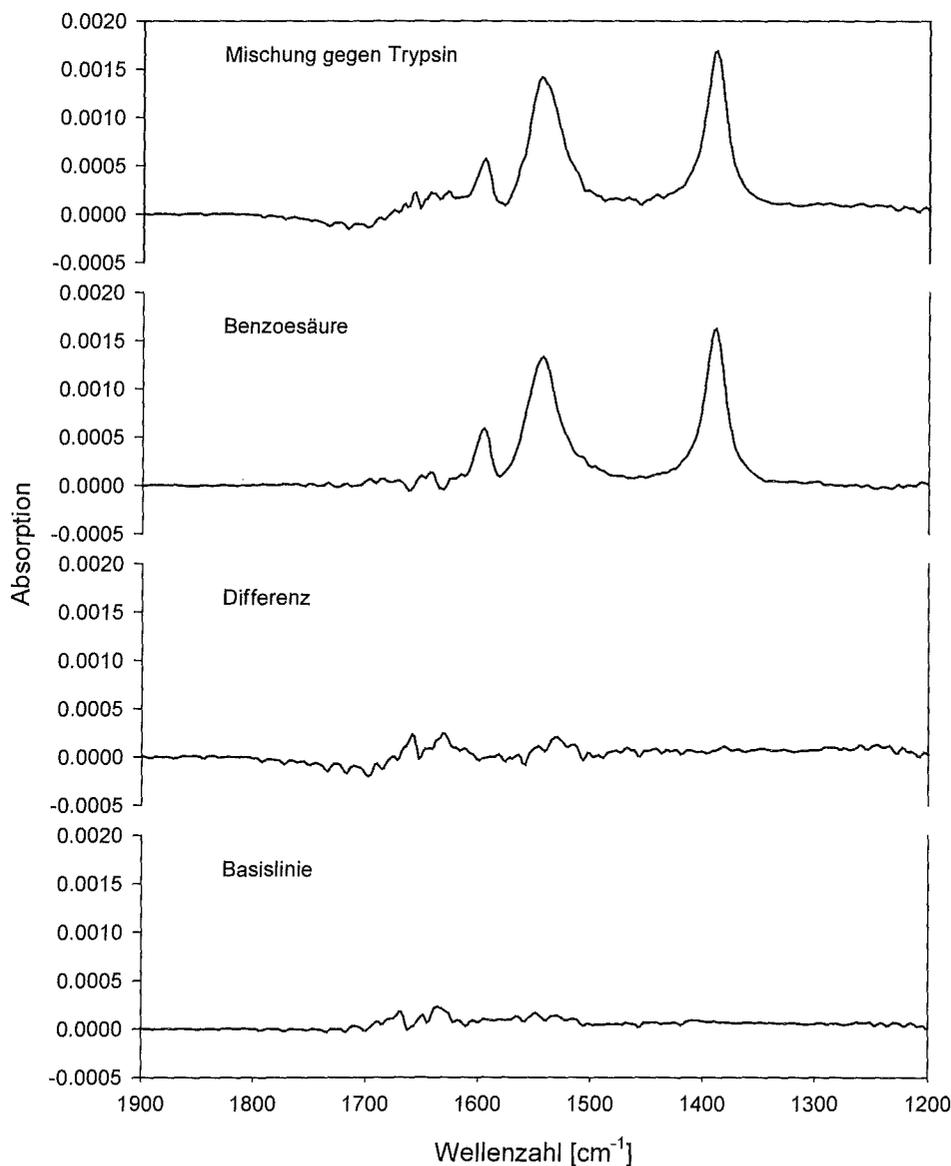


Abbildung 4-11 Darstellung aller für die Berechnung des Benzoessäure-Differenzspektrums verwendeten Spektren und der Basislinie (Trypsin gegen Trypsin).

Man erkennt deutlich, daß das Spektrum [Trypsin + Benzoesäure] - [Trypsin] genau dem Benzoesäurespektrum entspricht. Es findet also keine Komplexbildung statt. Diese Ergebnisse belegen erstmalig, daß die Unterscheidung zwischen bindenden und nicht-bindenden Substanzen mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie möglich ist.

Die Messungen mit Hydrozimsäure führen zum gleichen Ergebnis.

4.5.3 Leupeptin und Propionyl-Leupeptin

Als weitere Beispiele für Protein-Ligand-Wechselwirkungen wurden die Komplexbildungen mit Leupeptin und Propionyl-Leupeptin untersucht. In Abbildung 4-12 sind die Differenzspektren für die Bildung dieser Komplexe dargestellt. Beide Spektren weisen in der Bandenlage und der relativen Signalhöhe nur geringe Unterschiede auf. Änderungen in der Gesamtabsorption sind durch Abweichungen in der Dissoziationskonstante K_i und der zugegebenen Menge an Inhibitor bedingt.

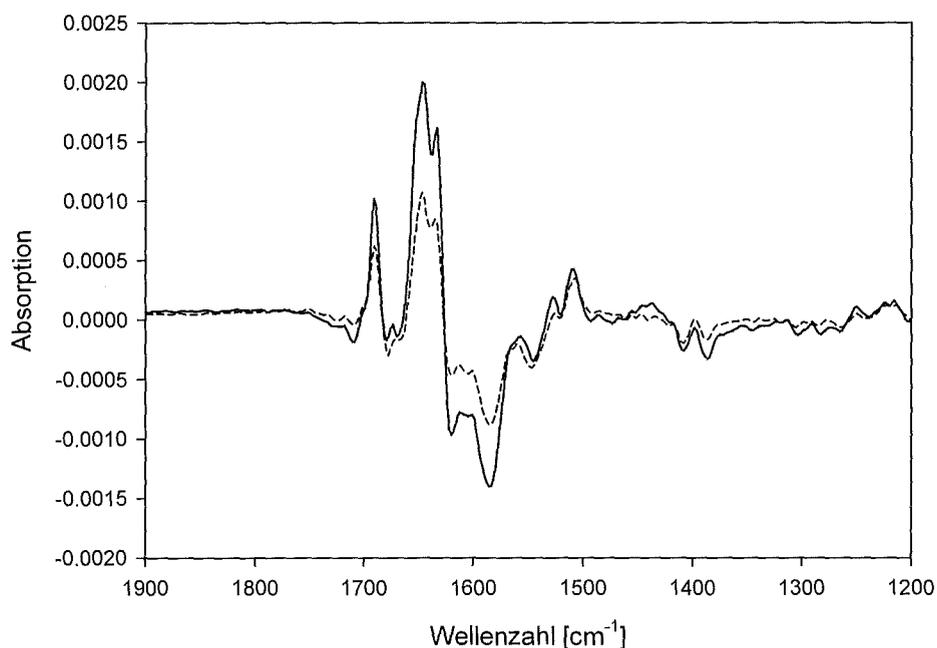


Abbildung 4-12 Differenzspektren für die Komplexbildung mit Leupeptin (durchgezogene Linie) und Propionyl-Leupeptin (gestrichelte Linie).

Das Signal bei 1691 cm^{-1} entspricht der NCN-Streckschwingung der Guanidinogruppe. Aufgrund der großen Analogien zum Differenzspektrum des Benzamidin-Komplexes scheinen die meisten Peaks eher Änderungen im Protein als im Hemmstoff zu entsprechen. Prinzipiell können aber auch Änderungen der Absorptionsbanden des Hemmstoffes zu den, durch die Komplexbildung hervorgerufenen, Signalen beitragen.

4.6 Vergleich der unterschiedlichen Liganden

In Abbildung 4-13 sind die Differenzspektren der Versuche mit den unterschiedlichen Substanzen im Vergleich gezeigt. In den Differenzspektren des Benzamidin, Leupeptin und Propionyl-Leupeptin sind deutliche Banden erkennbar, während die Differenzspektren für die Mischungen des Proteins mit Benzoesäure und Hydrozimsäure einer Basislinie entsprechen.

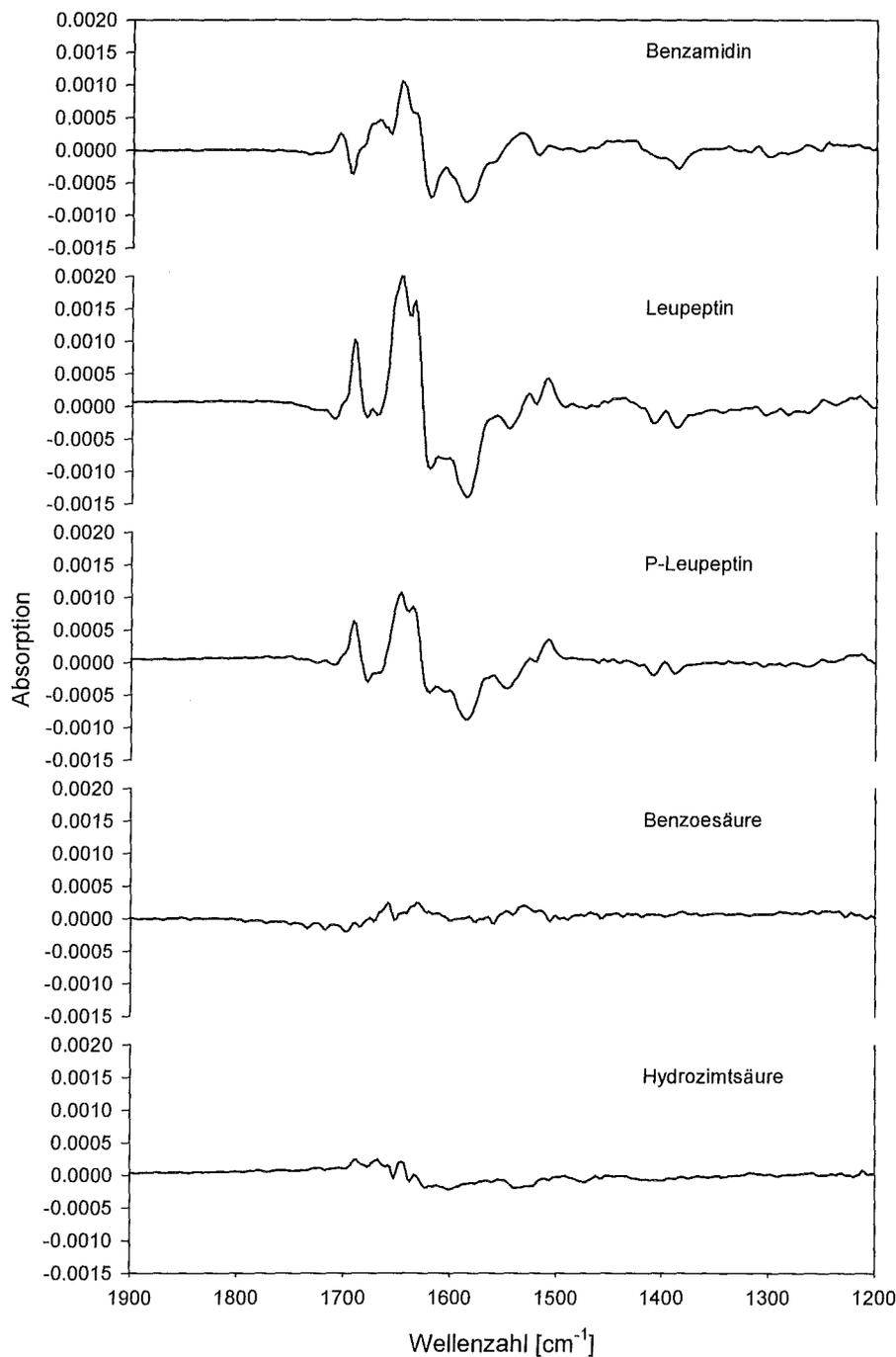


Abbildung 4-13 Vergleich der Differenzspektren für die Komplexbildung mit den unterschiedlichen Liganden.

Eine eindeutige Unterscheidung zwischen bindenden und nicht-bindenden Substanzen ist also in allen hier untersuchten Fällen möglich. Die Spektren der komplexbildenden Liganden weisen deutliche Gemeinsamkeiten auf. Bis auf die Signale um 1700 cm^{-1} , die vom den jeweiligen Liganden stammen, scheinen alle anderen Absorptionen von Bindungen des Proteins zu stammen.

Die Absorptionsänderungen im Bereich zwischen 1675 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} könnten Amid I Schwingungen entsprechen und daher auf Änderungen der Sekundärstruktur zurückzuführen sein. Für eine definitive Zuordnung zur Amid I Bande sind Messungen mit H/D-Austausch notwendig. Die Hauptbanden liegen bei 1645 cm^{-1} (positiv), 1633 cm^{-1} (positiv) und 1618 cm^{-1} (negativ). Es könnte sich daher um Änderungen der β -Faltblattstruktur (siehe Kapitel 2.4.2) in der Nähe des aktiven Zentrums handeln. Die Zunahme der Absorption bei 1645 cm^{-1} könnte auch durch eine Auflösung der β -Faltblattstruktur bedingt sein. Diese Zuordnung steht allerdings im Gegensatz zu der allgemeinen Annahme, daß die Konformation eines Proteins durch Komplexbildung stabilisiert wird.

Weitere Zuordnungen können auf Basis der charakteristischen Absorptionsfrequenzen der im Protein vorhandenen funktionellen Gruppen postuliert werden. So könnte z. B. die negative Bande bei 1583 cm^{-1} der antisymmetrischen Streckschwingung des freien Asp¹⁸⁹ zugeordnet werden. Als mögliche Zuordnung zu den Banden bei 1405 cm^{-1} bzw. 1385 cm^{-1} käme dann die symmetrische Streckschwingung in Frage.

Die Bande bei 1583 cm^{-1} ist bei Leupeptin und Propionyl-Leupeptin stärker ausgeprägt als bei Benzamidin. Bei diesen beiden Liganden könnten daher Wechselwirkung des Liganden mit dem His⁵⁷-Ring zu dieser Bande beitragen.

4.7 Verdrängung von Benzamidin durch Leupeptin

In manchen Fällen kann es sinnvoll sein, das zu untersuchende Protein mit Hilfe eines bekannten Inhibitors zu stabilisieren. Es wurde daher untersucht, ob sich die Verdrängung eines Liganden durch einen anderen, stärkeren Inhibitor mittels der FTIR-Differenzspektroskopie erfassen läßt. Durch Zugabe von 11 mM Benzamidin läßt sich eine bessere Stabilisierung des Trypsins erreichen als durch Verwendung von 0.1 M CaCl₂ (siehe Abbildung 4-8). Benzamidin ($K_i = 100\text{ }\mu\text{M}$) läßt sich durch Zugabe von Leupeptin ($K_i = 400\text{ nM}$) aus dem Komplex mit Trypsin verdrängen (Babine u. Bender 1997).

Das Differenzspektrum der Verdrängungsreaktion von 11 mM Benzamidin durch 2 mM Leupeptin ist in Abbildung 4-14 oben dargestellt. Bei der Verdrängungsreaktion werden Wechselwirkungen von Trypsin zu Leupeptin gebildet und diejenigen zu Benzamidin gelöst. Das Differenzspektrum dieser Verdrängungsreaktion muß daher der Differenz (siehe Abbildung 4-14, Reihe 2) zwischen dem Differenzspektrum der Komplexbildung mit

Leupeptin (Reihe 4) und dem der Komplexbildung mit Benzamidin (Reihe 3) entsprechen. Der Vergleich des gemessenen mit dem berechneten Spektrum zeigt eine hohe Übereinstimmung. Kleine Abweichungen sind dadurch bedingt, daß die Differenz ohne Skalierung berechnet wurde.

Verdrängungsreaktionen lassen sich also auch mittels der FTIR-Spektroskopie von Protein-Ligand-Wechselwirkungen untersuchen. Wie zu erwarten entspricht das Spektrum der Verdrängungsreaktion der Differenz der Spektren der beiden Komplexbildungen.

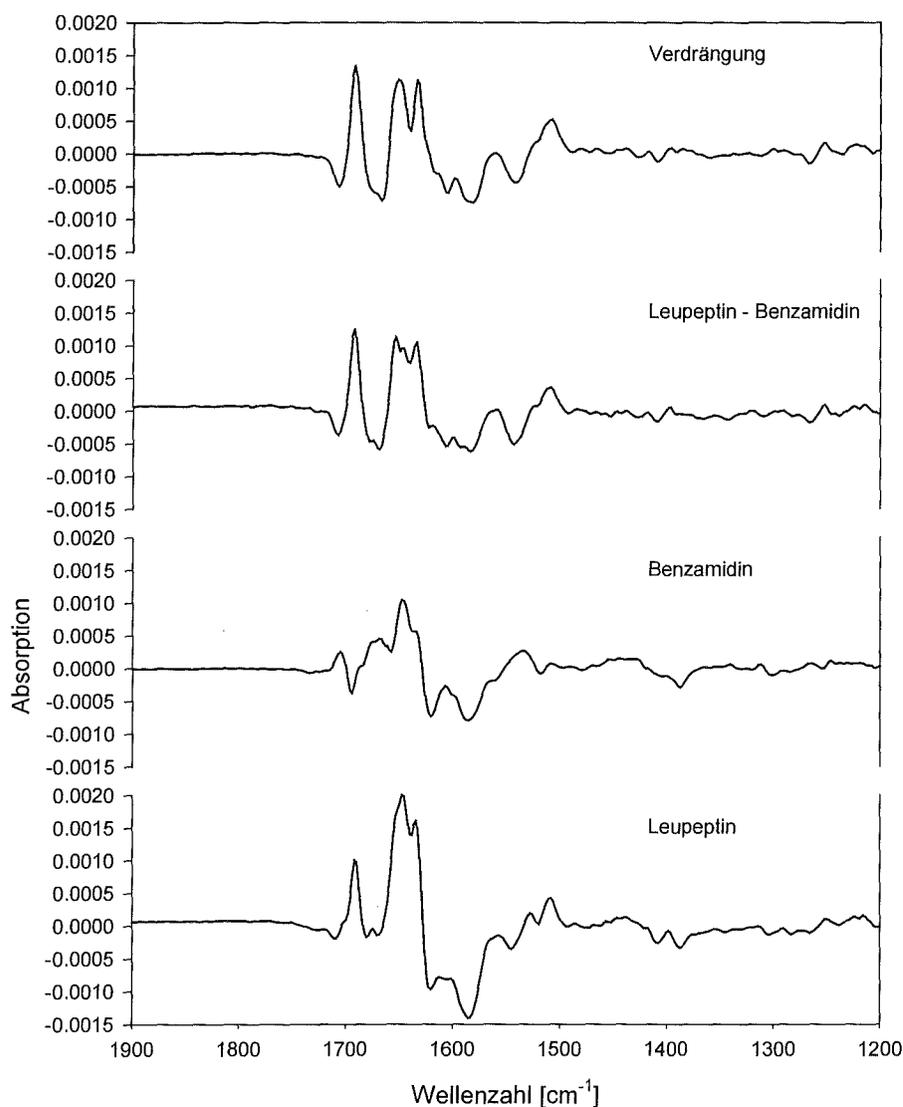


Abbildung 4-14 Vergleich des gemessenen Differenzspektrums der Verdrängungsreaktion von Benzamidin durch Leupeptin (oben) mit dem aus der Differenz der beiden Einzelspektren berechneten (zweite Reihe). Die beiden Einzelspektren sind zur besseren Verständlichkeit ebenfalls gezeigt.

4.8 Reproduzierbarkeit der Spektren

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die Komplexbildung eines Proteins mit einem Liganden zu einem charakteristischen FTIR-Differenzspektrum führt, soll nun die Reproduzierbarkeit dieser Spektren geprüft werden.

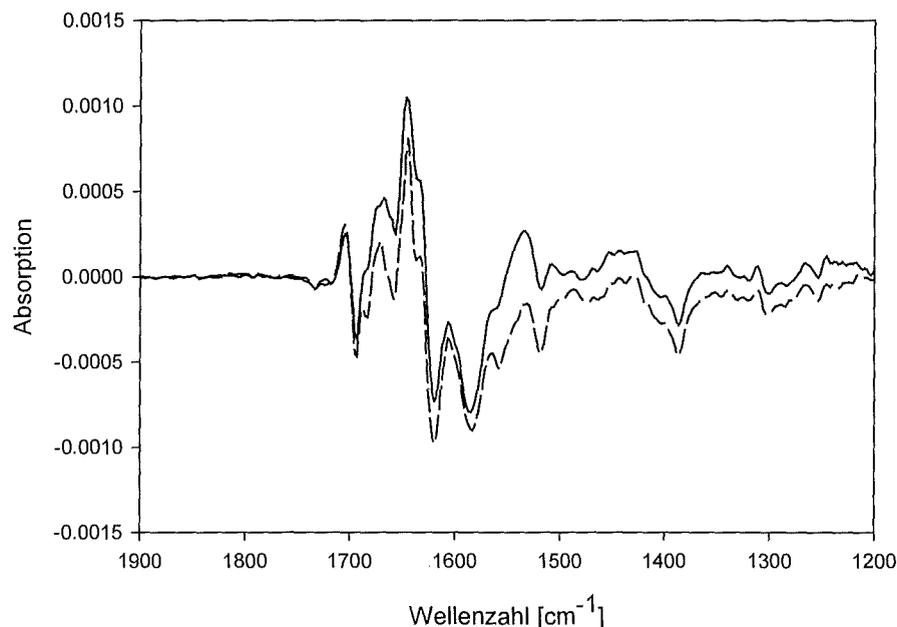


Abbildung 4-15 Reproduzierbarkeit der Spektren für den Trypsin-Benzamidin-Komplex. Dargestellt sind zwei Spektren aus unterschiedlichen Versuchsreihen.

In Abbildung 4-15 sind zwei Differenzspektren des Komplexes zwischen Trypsin und Benzamidin gezeigt. Die Spektren wurden mit jeweils frisch angesetzten Lösungen im Abstand von einigen Tagen aufgenommen. Die Lage der Banden und ihre relative Höhe ist sehr gut reproduzierbar. Der geringe Unterschied stammt aus einer Verschiebung der Basislinien, die hier nicht korrigiert ist.

4.9 Einfluß des Lösungsmittels

4.9.1 Wirkung von DMSO auf Proteine

Notwendigkeit des Einsatzes von DMSO

Da viele als Inhibitoren wirkende Substanzen, wie z. B. Peptide und Peptidmimetika, nicht in Wasser bzw. wäßrigen Puffersystemen löslich sind, wird häufig DMSO als Lösungsmittel eingesetzt. DMSO ist ein dipolares, aprotisches Lösungsmittel mit einer Dielektrizitätszahl von 46.45 (CRC 1994). Es ist in der Lage, als Wasserstoffbrückenakzeptor zu wirken. DMSO ist eines der wenigen organischen Lösungsmittel, die Proteine lösen. Aufgrund der hohen

Löslichkeit von Proteinen und Peptiden in DMSO wird es häufig als Alternative zu wäßrigen Systemen verwendet (Jacob et al. 1971; Martin u. Hauthal 1975).

Es gilt also zu untersuchen, bis zu welchen Konzentrationen kein Einfluß von DMSO auf das Differenzspektrum der Komplexbildung zu erwarten ist.

Einfluß auf die Aktivität von Proteinen

Untersuchungen der enzymatischen Aktivität von Enzymen in verschiedenen mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmitteln ergaben, daß die katalytische Aktivität bei hohem Wassergehalt in der Regel erhalten bleibt. Auch bei zweiphasigen Systemen aus Wasser und einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel bleibt die enzymatische Aktivität erhalten, da sich wasserlösliche Proteine ausschließlich in der wäßrigen Phase anreichern. Verwendet man dagegen organische Lösungsmittel mit sehr geringem Wassergehalt, ist die Aktivität in der Regel in hydrophoben Lösungsmitteln höher (Zaks u. Klibanov 1988; Klibanov 1989). Hydrophile Lösungsmittel entfernen das auf der Oberfläche gebundene Wasser und verändern so die Struktur der Proteine, während sich bei hydrophoben Lösungsmitteln in der Nähe von hydrophilen Resten Wassercluster bilden, durch die die Funktion aufrechterhalten wird. Die Substrat- und Inhibitorspezifität eines Enzyms wird in organischen Lösungsmitteln durch Veränderung der Wasserstoffbrückensysteme beeinflusst.

Einfluß auf die Struktur von Proteinen

Bei geringen Konzentrationen hat DMSO keinen merklichen Effekt auf die Sekundärstruktur von Proteinen (Jackson u. Mantsch 1991; Bhattacharjya u. Balaram 1997). Jedoch zeigt Lysozym in nah-UV CD Untersuchungen bei steigenden DMSO Konzentrationen (> 10%) eine Konformationsänderung in einen neuen, nur teilweise gefalteten Zustand (Bhattacharjya u. Balaram 1997). Dieser Zustand ähnelt dem ersten Intermediat bei der Faltung von Lysozym. Der Übergang ist bei ~50% DMSO größtenteils vollständig abgelaufen. Bei Konzentrationen > 50% kommt es zum Übergang in den vollständig ungefalteten Zustand. Die Dispersion der chemischen Verschiebung der ¹H-NMR-Spektren des Lysozyms zeigt die selben Übergänge vom nativen über einen hauptsächlich α -helicalen in den ungefalteten Zustand.

Bei Concanavalin A und Myoglobin wurden bei einer DMSO Konzentration bis zu 60% keine Änderungen der Amid I IR-Bande gefunden, die auf eine abweichende Konformation hindeuten. Bei einer weiteren Erhöhung der DMSO Konzentration zeigt sich eine Zunahme der 1621 cm⁻¹ Absorption, die den für das Lösungsmittel zugänglichen Enden eines β -Faltblatts zugeordnet werden (Jackson u. Mantsch 1991). Jedoch können Banden an dieser Stelle auch durch Denaturierung hervorgerufen werden. Sie reflektieren dabei intermolekulare Wasserstoffbrücken oder Aggregation. Dies beruht auf der Konkurrenz des starken Wasserstoffbrückenakzeptors S=O des DMSO mit den C=O-Gruppen der Peptidbindung um die

NH-Gruppen der Peptidbindungen. Dies führt zu einem Aufbrechen von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen und zu einer Zerstörung der Sekundärstruktur des Proteins. Folglich stehen mehr C=O und NH-Gruppen für die Bildung von intermolekularen Wasserstoffbrücken zur Verfügung. Die Bildung von β -Faltblattstrukturen in DMSO wurde sowohl bei globulären als auch bei Membranproteinen bereits beobachtet. Bei Konzentrationen größer 80% DMSO erscheint ein weiteres Band bei 1662 cm^{-1} , das C=O-Gruppen zugeordnet wird, die nicht an Wasserstoffbrücken beteiligt sind. Bei diesen hohen DMSO Konzentrationen werden nicht nur intramolekulare sondern auch intermolekulare Wechselwirkungen zerstört, so daß „freie“ C=O-Gruppen vorhanden sind. Dieser Prozeß schreitet bei Erhöhung des DMSO Anteils bis zur völligen Zerstörung der Sekundärstruktur des Concanavalin A fort.

Bei α -Casein, einem Protein ohne reguläre Sekundärstruktur, kehrt sich der Effekt um (Jackson u. Mantsch 1991). Hier scheint durch die DMSO Zugabe eine Struktur induziert zu werden.

Einfluß auf die Eigenschaften der Proteine

Gleichzeitig wird die thermische Stabilität der Proteine durch die Abnahme der Zahl intramolekularer Wasserstoffbrücken auch schon bei geringem DMSO Anteil deutlich reduziert (Jackson u. Mantsch 1991). Auch diese Destabilisierung wird ausgelöst durch die Konkurrenz von S=O- mit C=O-Gruppen um die $^2\text{H-N}$ -Gruppen. Auch wenn die Störungen noch nicht zu großen Veränderungen in der Sekundärstruktur führen, reichen sie wohl aus, um die thermische Stabilität zu verringern.

Gleichzeitig können die Konformationsänderungen des Proteins zu einem starken Anstieg der Viskosität und einem pseudoplastischen Verhalten der Lösungen führen (Areas et al. 1996). Dabei steigt die Viskosität der Lösung bei Erhöhung der Proteinkonzentration überproportional an. Dieser Effekt wird ebenfalls durch eine Aggregation und Orientierung der Proteinmoleküle in der Lösung ausgelöst.

Auswirkungen auf die FTIR-Differenzspektroskopie von Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Auf jeden Fall ändert sich bei unterschiedlichem DMSO Gehalt der Lösungen das Wasserstoffbrückensystem an der Oberfläche der Proteinmoleküle. Das heißt, bei Erhöhung des DMSO Anteils in der Proteinlösung werden Wasserstoffbrücken zu Wassermolekülen auf der Oberfläche des Proteins gelöst und solche zu DMSO Molekülen neu gebildet. Dadurch ändert sich die IR-Absorption des Systems.

4.9.2 Differenzspektren bei unterschiedlichen DMSO Gehalt

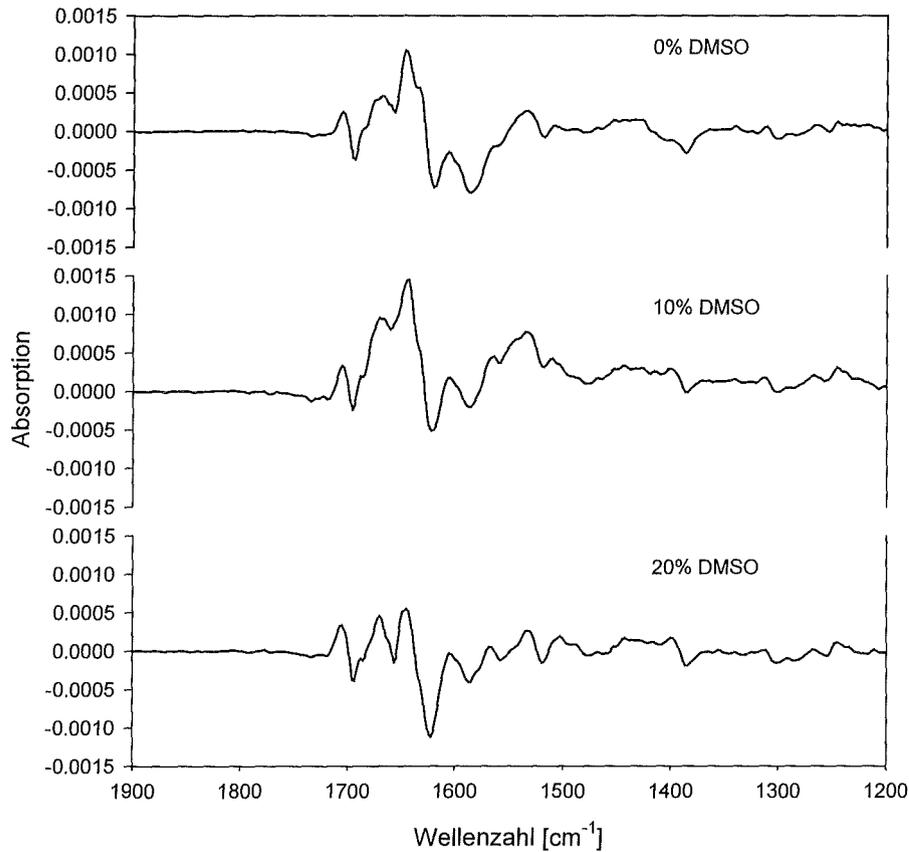


Abbildung 4-16 *Einfluß von DMSO auf die Differenzspektren des Benzamidin-Komplexes.*

Zur Untersuchung des Einflusses von DMSO auf die Differenzspektren des Benzamidin-Komplexes wurden Proteinlösungen in 0, 10 und 20% DMSO verwendet. In Abbildung 4-16 sind diese Spektren dargestellt. Es ist keine Bandenverschiebung erkennbar. Die Änderungen der Spektren sind auf eine Abnahme des Autolysegrades bei höherer DMSO Konzentration zurückzuführen. Außerdem sind bei 1450-1400 cm^{-1} und 1310 cm^{-1} Reste von DMSO in den Spektren erkennbar, die durch minimale Konzentrationsfehler bei sehr großen Absorptionen des DMSO zwischen den Messungen bedingt sind. Bei Trypsin scheinen die untersuchten DMSO Konzentrationen noch nicht zu signifikanten Änderungen in der Sekundärstruktur zu führen. Allerdings weist die Hemmung der Autolyse auf eine geringere Aktivität des Trypsins oder eine Konformationsänderung im Bereich des Autolyseloops, d. h. der Schnittstelle für die Umwandlung von β - in α -Trypsin (siehe Kapitel 4.4), hin.

4.10 Ergebnisse

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, daß die Unterscheidung zwischen bindenden und nicht-bindenden Substanzen mit Hilfe der FTIR-Differenzspektroskopie möglich ist.

Entgegen der allgemeinen Literaturmeinung lassen sich kleine Konformationsänderungen auch durch den Vergleich von zwei Lösungen erkennen. Die erhaltenen Differenzspektren sind von der Signalqualität vergleichbar mit licht- bzw. redoxinduzierten Differenzspektren.

Die Spektren der Komplexbildungen von Trypsin mit Benzamidin, Leupeptin und Propionyl-Leupeptin besitzen deutliche Banden, die auf die Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand zurückzuführen sind. Im Gegensatz dazu führt die Mischung mit einer nicht-bindenden Substanz zu einer Basislinie. Die erhaltenen Spektren sind gut reproduzierbar. Das Verhältnis zwischen Amplitude der Differenzbanden und der Totalabsorption des Proteins zeigt, daß die Komplexbildung nur mit kleinen Änderungen der Konformation verbunden ist.

Die Autolyse des Trypsins, die als Kontrollmöglichkeit für die Bindung des Liganden untersucht wurde, führt ebenfalls zu einem reproduzierbaren Differenzspektrum. Durch Zugabe von CaCl_2 läßt sie sich soweit unterdrücken, daß Differenzspektren der Komplexbildungen aufgenommen werden können, die nur noch einen geringen Anteil an Autolysebanden enthalten.

Eine sinnvolle Möglichkeit zur Stabilisierung von Proteinen ist die Zugabe eines Liganden. Daher wurde untersucht, ob sich die Verdrängung eines Liganden durch einen anderen ebenfalls FTIR-differenzspektroskopisch nachweisen läßt. Dies konnte am Beispiel der Verdrängung von Benzamidin durch Leupeptin gezeigt werden.

Viele interessante Inhibitoren sind schlecht oder gar nicht wasserlöslich. Eine gute Alternative sind in diesen Fällen DMSO-haltige Puffergemische. Da DMSO analog zu Wasser mit Aminosäuren an der Proteinoberfläche wechselwirkt, wurde der Einfluß unterschiedlicher DMSO Konzentrationen auf Differenzspektren untersucht. Bis zu einer Konzentration von 10% konnte keine Veränderung des Differenzspektrum festgestellt werden. Die Veränderungen bei einer DMSO Konzentration von 20% scheinen eher auf eine Hemmung der Autolyse, d. h. auf einen geringeren Anteil an Autolysebanden, als auf einer Änderung der durch die Komplexbildung hervorgerufenen Banden zu beruhen.

5 Möglichkeiten zur Automatisierung

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, daß mit Hilfe der FTIR-Differenzspektroskopie eine Unterscheidung zwischen bindenden und nicht-bindenden Substanzen möglich ist. Die Suche nach Liganden für die unterschiedlichsten Proteine spielt eine herausragende Rolle in der Arzneimittelforschung. Dort werden täglich Tausende von chemischen Substanzen auf ihre Bindungsfähigkeit an verschiedene Proteine getestet. Hauptziel ist dabei das Auffinden neuer Inhibitoren für pharmazeutisch interessante Proteine. So wurden bei Glaxo Wellcome 1996 von vier Mitarbeitern mittels vollautomatisierter Robotersysteme täglich 50 000 Substanzen auf ihre inhibitorische Wirkung getestet (GlaxoWellcome 1996). Dabei werden pro Targetprotein bis zu 200 000 Substanzen getestet. Die Größe der Substanzbibliotheken, die den pharmazeutischen Firmen zur Verfügung stehen, nimmt dabei besonders durch den vermehrten Einsatz von Syntheseautomaten und der kombinatorischen Chemie (GlaxoWellcome 1996; Plunkett u. Ellman 1997) ständig zu. Am Ende dieser Testprozeduren steht natürlich kein fertiges Medikament, sondern nur eine Anzahl potentieller Leitstrukturen. Diese müssen anschließend von den medizinischen Chemikern in Bezug auf Bioverfügbarkeit (Aufnahme in den Körper nach Verabreichung), Pharmakokinetik (Abbau im Körper), Toxizität und absoluter Spezifität noch getestet und verbessert werden (Broach u. Thorner 1996).

Eine wichtige Aufgabe ist es, Verfahren zu entwickeln, mit denen die potentiellen Leitstrukturen aus den vielen tausend Substanzen ausgewählt werden können. Hauptmerkmal einer solchen Leitstruktur, die zu einem medizinisch wirksamen Inhibitor entwickelt werden kann, ist die Fähigkeit, an das Targetprotein zu binden.

Das oben dargestellte Verfahren der statischen Differenzbildung ist für den Einsatz in der Arzneimittelforschung nur bedingt geeignet. Um eine ausreichende Präzision der Messung zu erreichen, muß der Ligand als 100-fach konzentrierte Stammlösung vorliegen. Nicht jede pharmakologisch interessante Substanz besitzt eine dafür ausreichende Löslichkeit. Im Arzneimittelscreening werden daher 5 mM Lösungen der zu untersuchenden Substanzen in DMSO vorgelegt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten daher Möglichkeiten untersucht werden, das in Kapitel 4.3 vorgestellte Verfahren so zu modifizieren, daß eine automatisierte FTIR-differenzspektroskopische Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen und der Einsatz von schwach konzentrierten Lösungen der zu untersuchenden Substanzen möglich ist.

5.1 Kinetik der Reaktion zwischen Protein und Ligand

Bei der FTIR-Differenzspektroskopie werden die Unterschiede zwischen zwei verschiedenen Zuständen eines Proteins untersucht. Diese zwei Zustände sind in der Regel Anfangs- und Endzustand einer Reaktion. Zum Auslösen der Reaktion wird ein Trigger benötigt. Bei der Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen soll als Anfangszustand eine Mischung des Proteins mit dem Inhibitor und als Endzustand der Komplex angesehen werden. Findet zwischen den beiden Reaktanden keine Reaktion statt, so liegen die beiden Stoffe auch im Endzustand getrennt nebeneinander vor.

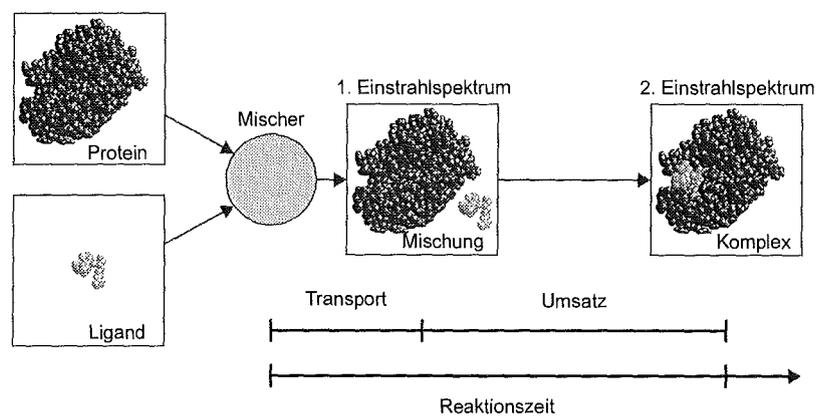
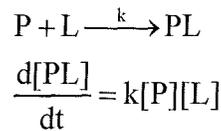


Abbildung 5-1 Schema der kinetischen Meßmethode für die FTIR-Differenzspektroskopie.

Ein denkbarer Ansatz zur Durchführung der 1. und 2. Messung aus Abbildung 5-1 wäre die zeitaufgelöste Spektroskopie. Die Reaktion wird dabei durch Mischen der beiden Reaktanden gestartet. Der Anfangszustand wird nach dem Mischen, aber vor der Reaktion bzw. bei noch sehr geringem Umsatz der Reaktion gemessen. Nach einer Wartezeit, in der die Reaktion weiter abläuft, kann das Spektrum des Komplexes gemessen werden. Während der Wartezeit sollte ein möglichst vollständiger Umsatz der beiden Reaktanden erfolgen. Die Zunahme der Konzentration des Komplexes zwischen erster und zweiter Messung führt zu den Differenzsignalen. Die Amplitude der Differenzsignale ist von der Differenz der Konzentration des Komplexes zwischen erster und zweiter Messung abhängig. Obwohl diese Methode für unterschiedliche Reaktionen von Proteinen bereits verwendet wird (White et al. 1995), wenn auch nicht in für H_2O geeigneten Schichtdicken, kann gezeigt werden, daß die erreichbare Zeitauflösung im Rapid Scan Modus im allgemeinen für die Untersuchung von Protein-Ligand-Reaktionen nicht ausreichend ist. Diese Methode ist nur geeignet für besonders langsame bindungsinduzierte Konformationsänderungen. Ein solches Verfahren wäre also nicht universell einsetzbar.

Anhand einer Modellrechnung wird die Geschwindigkeit von Protein-Ligand-Reaktionen im Folgenden abgeschätzt. Alle Protein-Ligand-Reaktionen besitzen eine Kinetik 2. Ordnung.

Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt daher mit steigender Konzentration der Reaktanden zu. Als Maß für die Reaktionszeit soll die Zeit dienen, in der ein 90% Umsatz der eingesetzten Reaktanden erfolgt (siehe Gleichung 5-1).



für $[P] = [L]$ gilt :

$$t = \frac{1}{k} \cdot \frac{[PL]}{[P]_0([P]_0 - [PL])}$$

$$t_{1/2} = \frac{1}{k[P]_0}$$

$$t_{90} = \frac{9}{k[P]_0}$$

Gleichung 5-1 Berechnung der Zeit t_{90} für 90% Umsatz bei einer Reaktion 2. Ordnung und äquimolaren Ausgangskonzentrationen. Konzentration des Komplexes: $[PL]$, Konzentration des Proteins $[P]$ und des Liganden $[L]$, Ausgangskonzentrationen haben den Index 0. Halbwertszeit: $t_{1/2}$.

Einige bekannte Protein-Ligand-Reaktionen (siehe Tabelle 5-1) besitzen Geschwindigkeitskonstanten im Bereich von $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Da für die FTIR-Differenzspektroskopie Konzentrationen der Reaktanden von ungefähr 1 mM benötigt werden, sind die Reaktionen sehr schnell.

Avidin/Biotin	$7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(Green 1963)
Salicylathydroxylase/Salicylat	$1.8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(White-Stevens u. Kamin 1972)
Globin/Carboxyhäm	$5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(Gibson u. Antonini 1960)

Tabelle 5-1 Geschwindigkeitskonstanten k_{on} einiger Protein-Ligand-Reaktionen.

Beim Avidin/Biotin-System berechnet sich nach Gleichung 5-1 die Reaktionszeit für eine Ausgangskonzentration von Avidin und Biotin von jeweils 1 mM und einem Umsatz von 90 % zu 0.13 ms ($k_{on} = 7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Sie liegt daher weit unter den meßbaren Zeiten. Der Konzentrationsverlauf während dieser Reaktion ist in Abbildung 5-2 gezeigt. Die hohe Geschwindigkeitskonstante k_{on} der Avidin/Biotin-Reaktion stellt keinen Sonderfall dar. Die bekannte starke Affinität dieses Systems ($K = 10^{15}$) ist vielmehr durch eine besonders schwache Dissoziation bzw. eine sehr niedrige Rate k_{off} bedingt.

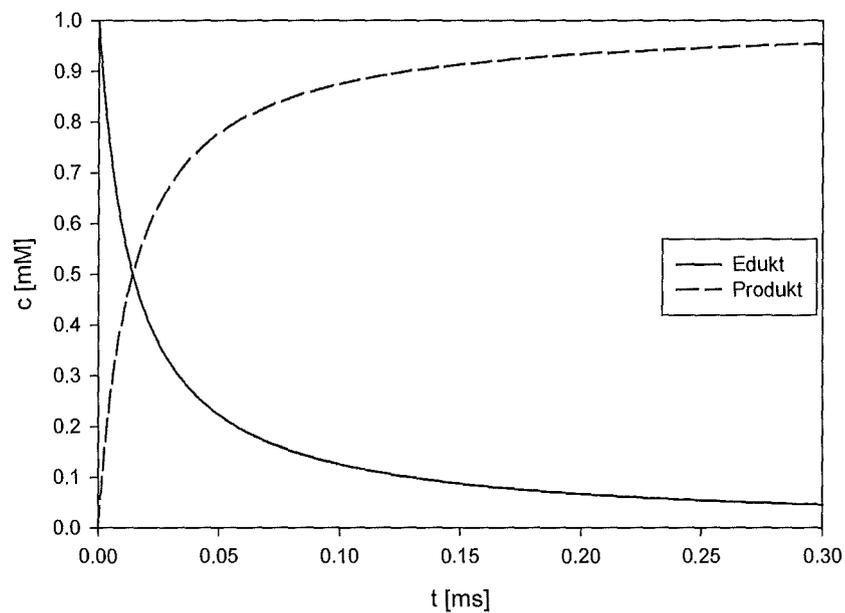


Abbildung 5-2 Konzentrationsverlauf der Edukte und des Produktes während der Komplexbildung von Avidin mit Biotin bei einer Ausgangskonzentration von 1 mM beider Edukte.

5.2 Unterschiedliche Meßverfahren

Der Einsatz eines Stopped-Flow Systems in Verbindung mit *Rapid Scan* Messungen ist daher für einen universellen Einsatz der FTIR-differenzspektroskopischen Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen nicht geeignet. Um Stopped-Flow Verfahren einsetzen zu können, müßten Messungen mit einer Zeitauflösung im Mikrosekundenbereich durchgeführt werden. Der Einsatz von Stroboskop- oder *Step Scan* Messungen erfordert die tausendfache Wiederholung der Reaktion. Da Reaktionen zwischen Protein und Ligand nicht zyklisch ablaufen, führt dies zu einem übermäßig hohen Probenverbrauch.

Um trotzdem mittels der FTIR-Differenzspektroskopie Protein-Ligand-Wechselwirkungen untersuchen zu können, muß die hohe Reaktionsgeschwindigkeit entweder reduziert oder umgangen werden.

Hier bieten sich folgende Möglichkeiten an:

- Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeit
 - tiefe Temperatur
 - Diffusionslimitierung
- Getrennte Messung der Ausgangsprodukte
 - Mischmethode
 - Drei-Kammer-Zelle

Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeit

Übliche Verfahren zur Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeit sind das Durchführen der Reaktionen bei tiefen Temperaturen oder die Verschiebung des kinetischen Regimes in den Bereich, in dem die Diffusion geschwindigkeitsbestimmend ist. Die Durchführung bei tiefen Temperaturen führt zu keiner ausreichenden Geschwindigkeitsabnahme, da die Lösung maximal bis zum Gefrierpunkt des Wassers gekühlt werden kann und eine Erniedrigung der Temperatur um 10 K normalerweise die Reaktionsgeschwindigkeit um einen Faktor 2-3 reduziert. Insgesamt verlangsamt sich die Reaktionsgeschwindigkeit beim Übergang von Raumtemperatur auf 277 K also um den Faktor 4-6.

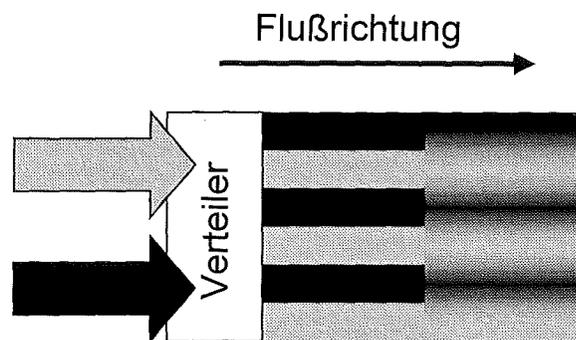


Abbildung 5-3 Schematische Darstellung der Streifenmethode zur Verschiebung der Kinetik in das Diffusionsregime.

Eine in Betracht gezogene Möglichkeit zur Verschiebung des kinetischen Regimes in den diffusionslimitierten Bereich besteht darin, die beiden Lösungen als Streifen nebeneinander in die Zelle fließen zu lassen. Ein entsprechender Aufbau ist mikrosystemtechnisch in Mikroreaktoren und Mikromischern bereits realisiert. Die Geschwindigkeit der Reaktion ließe sich dabei über die Breite der Streifen in Abhängigkeit von den Diffusionskoeffizienten des Proteins und des Liganden nahezu beliebig einstellen.

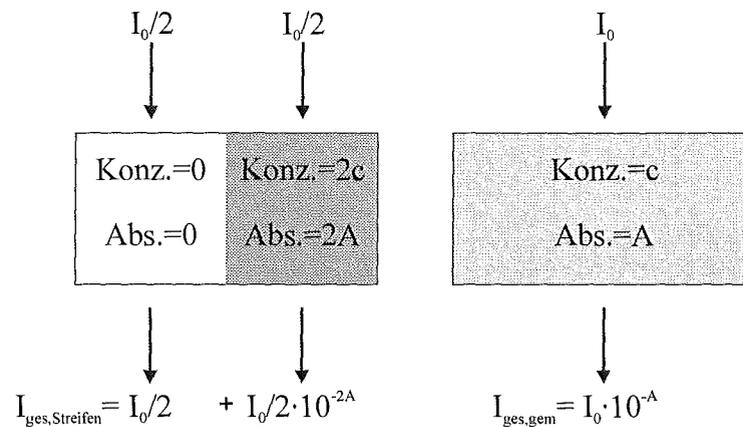


Abbildung 5-4 Änderung der gemessenen Intensität durch die Diffusion bei der Streifenmethode. Dargestellt ist die Mischung eines einzelnen Reagenzes mit dem gleichen Volumen einer nichtabsorbierenden Lösung. Ausgangsintensität des Strahls: I_0 . Die Intensität nach den getrennten Lösungen $I_{\text{ges,Streifen}}$ ist nur gleich der Intensität nach der Mischung $I_{\text{ges,gem}}$, wenn $10^{-A} = 1$, also $A = 0$, d. h. der Strahl wird nicht absorbiert.

Allerdings führt die Diffusion zu Änderungen der Inhomogenitäten in der Lösung, da sich die Konzentration der Reaktanden in jedem Volumenelement ständig ändert. Diese Änderungen führen schon alleine zu Änderungen der Absorption des Gesamtsystems. Zwei Lösungen nebeneinander (getrennte Streifen) haben nicht die selbe Absorption wie eine Mischung der beiden Lösungen (Endzustand der Diffusion). Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 5-4 dargestellt. Dieser Fehler läßt sich mathematisch nur dann korrigieren, wenn die Ausgangssituation, d. h. die total getrennten Streifen ohne Mischzone dazwischen, spektroskopisch erfaßt wird. Dies ist technisch aufgrund der geringen Diffusionszeiten nicht möglich, so daß diese Lösung verworfen werden muß.

Getrennte Messung der Ausgangsprodukte

Da eine Reduktion der Geschwindigkeit der Reaktion nicht möglich erscheint, müssen die Spektren der beiden Ausgangsstoffe separat erfaßt werden.

1. Mischverfahren

Eine Möglichkeit zur getrennten Erfassung der Spektren der Ausgangsstoffe besteht darin, den Komplex durch Mischung des Proteins mit dem Liganden herzustellen. Als Referenz für die Messung des Spektrums $[\text{Protein} + \text{Ligand}] - [\text{Protein}]$ dient dann eine Mischung des Proteins mit Puffer. Für die Erfassung des Differenzspektrums sind dabei vier Messungen nötig. Das Verfahren ist in Abbildung 5-5 dargestellt.

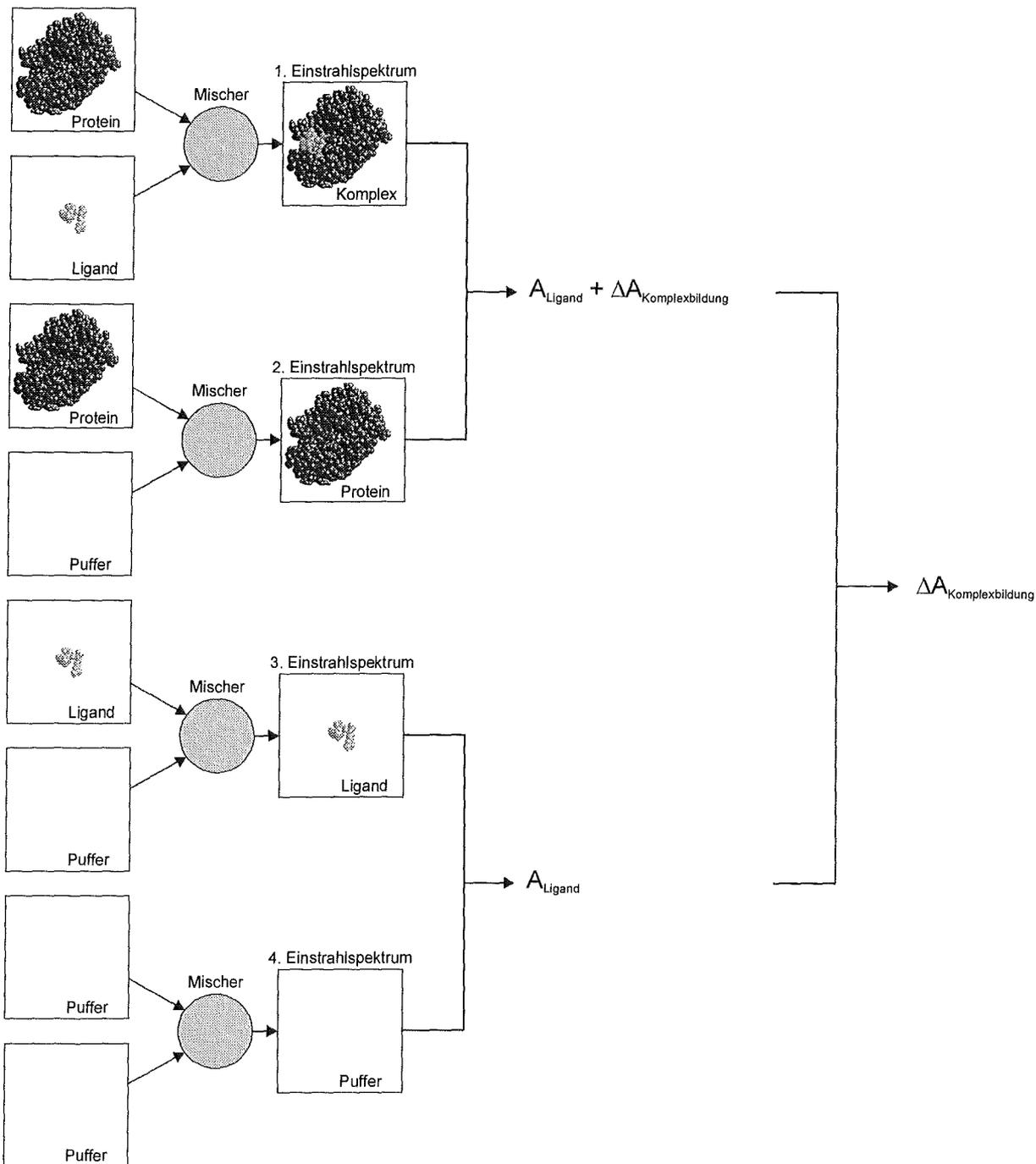


Abbildung 5-5 Schema der Mischmethode zur FTIR-Differenzspektroskopie von Protein-Ligand-Wechselwirkungen.

Grundlage ist der Vergleich des Spektrums der 50:50 Mischung von Protein mit der zu untersuchenden Verbindung mit einer 50:50 Mischung aus Protein und Puffer. Das so erhaltene Spektrum enthält neben der durch die Komplexbildung induzierten Änderung auch das Spektrum des Liganden. Dieses wird in einer getrennten Messung einer 50:50 Mischung der Substanz mit Puffer gegen reinen Puffer bestimmt und subtrahiert. Voraussetzung für dieses Verfahren ist, daß das Mischungsverhältnis von 50:50 exakt eingehalten wird. Sonst führen Abweichungen in der Konzentration des Proteins zu Störungen, die größer sind als die

Differenzbanden. Um ein ausreichend genaues Mischungsverhältnis zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Pumpen und Mischer ausprobiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Kapitel 6 zu finden.

2. Drei-Kammer-Zelle

Eine andere Möglichkeit ist die Messung der beiden Lösungen in zwei getrennten Kammern, die senkrecht zur Strahlrichtung angeordnet sind. Das Spektrum der beiden getrennten Lösungen entspricht dem Spektrum der noch nicht abreagierten Mischung und wird als Referenz verwendet. Das Spektrum des Komplexes wird in einer gemeinsamen Kammer nach einer Mischstelle gemessen. Aus diesen beiden Spektren können die Differenzbanden direkt bestimmt werden. Durch diese Zelle kann der Probenverbrauch gegenüber der Mischmethode reduziert werden, da die Messungen mit nur einer Füllung der Zelle durchgeführt werden.

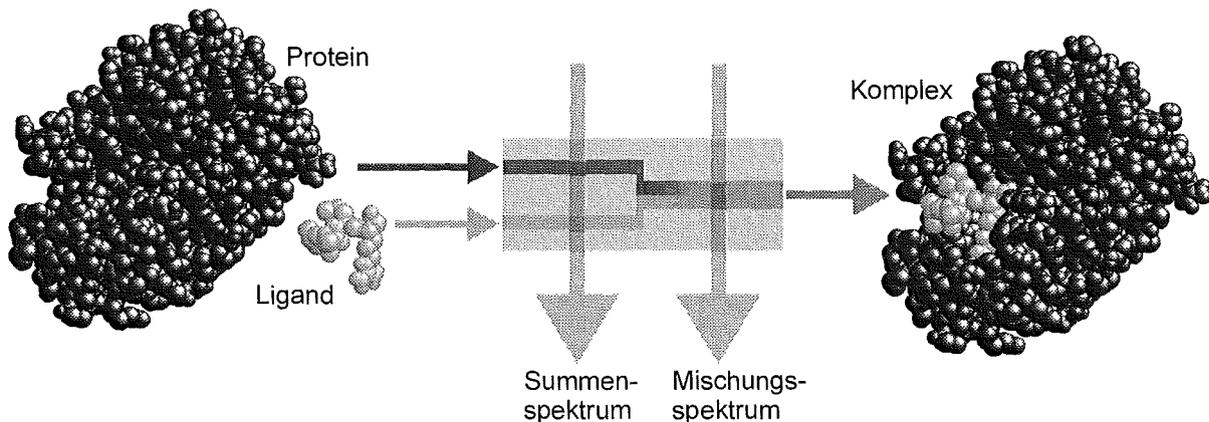


Abbildung 5-6 Schema der neu entwickelten Zelle mit zwei getrennten Kammern für die erste Messung.

Um die Gültigkeit des Lambert-Beer-Gesetzes zu gewährleisten, müssen die beiden getrennten Kammern genau die halbe Schichtdicke der gemeinsamen Kammer besitzen (siehe Gleichung 5-2). Eine schematische Darstellung einer solchen Zelle ist in Abbildung 5-6 zu sehen.

Lambert - Beer - Gesetz :

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Für die getrennten Kammern gilt :

$$A_{\text{gesamt}} = \varepsilon_1 \cdot c_1 \cdot l + \varepsilon_2 \cdot c_2 \cdot l$$

Für die gemeinsame Kammer gilt :

$$A_{\text{gesamt}} = (\varepsilon_1 \cdot c_1 / 2 + \varepsilon_2 \cdot c_2 / 2) \cdot 2l$$

Gleichung 5-2 Gültigkeit des Lambert-Beer-Gesetzes für die Drei-Kammer-Zelle.
Absorption: A , Extinktionskoeffizient: ε , Konzentration: c , Schichtdicke: l .

Eine solche Zelle wurde in Zusammenarbeit mit dem IMT (Institut für Mikrostrukturtechnik) des Forschungszentrums Karlsruhe hergestellt. Die Vorgehensweise und die Meßergebnisse mit dieser Zelle sind in Kapitel 7 beschrieben.

Zuvor werden jedoch die Ergebnisse zum Mischverfahren beschrieben.

6 Mischmethode

Als Mischmethode wird in dieser Arbeit der Vergleich des Spektrums einer 50:50 Mischung des Proteins und der zu untersuchenden Verbindung mit einer 50:50 Mischung aus Protein und Puffer bezeichnet. Das so erhaltene Spektrum enthält die durch die Komplexbildung induzierten Signale sowie alle Banden des Liganden. Das Spektrum des Liganden wird in einer separaten Messung bestimmt und verglichen bzw. subtrahiert. Um diese Methode mit Erfolg einsetzen zu können, muß das Mischungsverhältnis dabei ausreichend konstant sein, da Absorptionsänderungen aufgrund von Konzentrationsfehlern vermieden werden müssen. Daher wird im Folgenden die Konstanz des Mischungsverhältnisses mehrerer Systeme untersucht.

6.1 Vorgehensweise

Um zwei verschiedene Lösungen miteinander zu mischen, muß das in Kapitel 3.3.4.1 beschriebene Flußsystem so modifiziert werden, daß beide Lösungen aus zwei Proben-schleifen über einen Mischer in die Zelle gepumpt werden können. Nach dem Stopventil wird der von der Pumpe kommende Fluß über ein T-Stück auf die beiden Proben-schleifen verteilt. Der verwendete Aufbau ist in Abbildung 6-1 dargestellt.

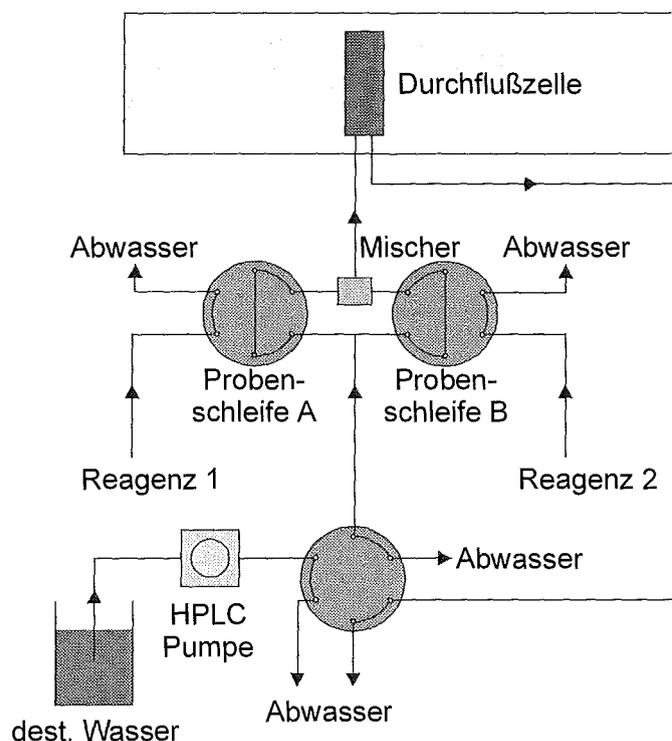
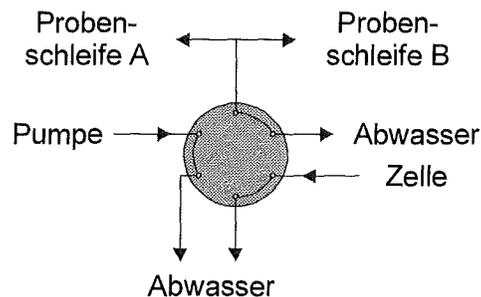


Abbildung 6-1 Modifiziertes Flußsystem für das Mischen zweier verschiedener Lösungen. Gezeigt ist das System bei gestopptem Fluß zur Meßzelle während der Messung.

Die beiden Probenschleifenventile werden mittels der in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Software simultan geschaltet. Der Schaltzyklus erfolgt analog zu Abbildung 3-10.

Zur Verbesserung des Mischungsverhältnisses wurden später zwei getrennte Antriebe für die beiden Lösungen eingesetzt. Gleichzeitig wurde von einer HPLC-Kolbenpumpe zu Spritzenpumpen gewechselt. Eine gleichzeitige Steuerung von zwei Pumpen sowie die Modifikationen, um mit einem Antrieb zwei Pumpen zu betreiben, ist nur mit Spritzenpumpen möglich. Um beide Flüsse mit einem einzigen Ventil stoppen zu können, mußte das 6-Port-2-Wege-Ventil durch ein entsprechendes 8-Port-Ventil ersetzt werden (siehe Abbildung 6-2). In der dargestellten Stellung ist der Fluß gestoppt. Gleichzeitig geht der Fluß von den beiden Pumpen, die auch mit diesem Aufbau nur Wasser pumpen, direkt zurück in das Reservoir mit destilliertem Wasser. Alternativ können die beiden Pumpen gestoppt werden. In dieser Stellung ist außerdem das Füllen der beiden Spritzen aus dem Reservoir möglich, indem die Bewegung der Kolben umgekehrt wird. Schaltet das 8-Port-Ventil, geht der Fluß der Pumpen durch je eine Probenschleife über den Mischer zur Zelle. Die Schaltung der Probenschleifenventile erfolgt analog zu Abbildung 3-10.

1 Pumpe für beide Seiten



2 Pumpen für je eine Seite

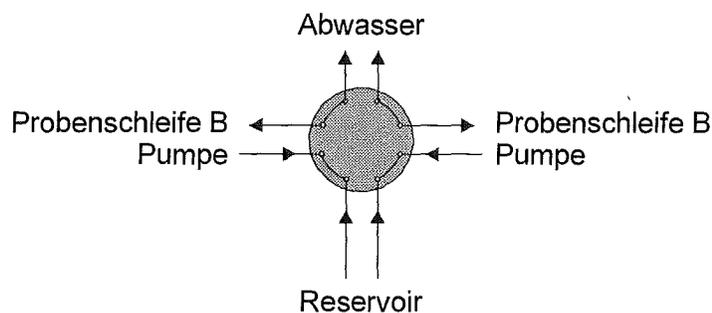


Abbildung 6-2 *Modifikation des Flußsystems für die Verwendung von zwei Pumpen.*

Zur Verfügung standen mehrere apparative Vorrichtungen, die im Rahmen dieser und parallel laufender Arbeiten angeschafft bzw. konzipiert und aufgebaut worden sind. Getestet wurde

das Flußsystem mit unterschiedlichen Mischern (T-Stück der Firma Alltech und Mikromischer des Instituts für Mikrotechnik Mainz) und Pumpen (HPLC-Pumpe der Firma Alltech, 2 Spritzenpumpen mit 8 ml Edelstahlspritzen der Firma Harvard Instruments und Spritzenpumpe mit Aufsatz für 2 Spritzen). Zwischen Mischer und Zelle ist ein Filterelement eingebaut, das das Verstopfen der Zelle verhindern und zusätzlich zu Turbulenzen führen soll. Als Proben wurden $K_4[Fe(CN)_6]$ ($\tilde{\nu}=2039\text{ cm}^{-1}$) und $K_3[Fe(CN)_6]$ ($\tilde{\nu}=2116\text{ cm}^{-1}$) verwendet, um den Einfluß der Viskosität zu eliminieren. Bei Verwendung von realen Systemen (Protein und Ligand) ist hier eine zusätzliche Schwierigkeit aufgrund der unterschiedlichen Viskosität der Lösungen zu erwarten.

Die Proben wurden mittels des Flußsystems in die Meßzelle gefördert, beim Erreichen des Plateaus wurde der Fluß gestoppt. Anschließend wurde nach einer Wartezeit zur Relaxation der Zelle ein FTIR-Spektrum des Zellinhalts aufgenommen. Die Absorption wurde nach dem Lambert-Beer-Gesetz mit der Wasser gefüllten Zelle als Referenz berechnet. Eine Offset-Korrektur der erhaltenen Spektren auf den Mittelwert der Absorption zwischen $2250\text{--}2200\text{ cm}^{-1}$ wurde durchgeführt, so daß eine Basislinienverschiebung um einen konstanten Wert keinen Einfluß auf die Standardabweichung hat. Das Mischungsverhältnis wurde aus den erhaltenen Absorptionen im Vergleich zur Absorption der verwendeten $K_4[Fe(CN)_6]$ bzw. $K_3[Fe(CN)_6]$ -Lösung berechnet, die in einem getrennten Versuch bestimmt wurden, und anschließend normiert. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden aus jeweils 10 Messungen gebildet. Als tatsächlicher Fehler wird die doppelte Standardabweichung betrachtet.

Die Versuche wurden bei unterschiedlichen Volumenströmen durchgeführt, um den Einfluß der Flußgeschwindigkeit auf das Mischungsverhältnis zu untersuchen. Angegeben ist jeweils der Volumenstrom zwischen Mischelement und Zelle.

6.2 Ergebnisse

6.2.1 HPLC-Pumpe und T-Stück

Im Ausgangssystem wurde eine Einkolben-HPLC-Pumpe verwendet. Als Mischer wurde ein T-Stück eingesetzt, das normalerweise zur Nachsäulederivatisierung in der HPLC eingesetzt wird. Laut Herstellerangabe hat es ein Innenvolumen von ca. $4\text{ }\mu\text{l}$. Das Mischprinzip ist in Abbildung 6-3 dargestellt. Die Mischung erfolgt konvektiv. Die beiden Lösungen strömen schräg gegen eine Wand und anschließend zurück. In der Kammer sollen Turbulenzen auftreten. Am Ausgang ist ein Filter angebracht, der zu zusätzlichen Turbulenzen führen soll.

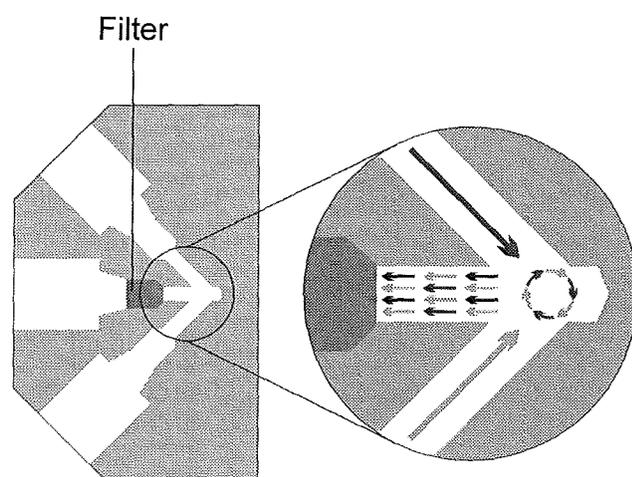


Abbildung 6-3 Mischprinzip des eingesetzten T-Stücks.

Die Ergebnisse der Versuche mit dem T-Stück und der HPLC-Pumpe sind in Tabelle 6-1 zusammengefaßt.

HPLC-Pumpe und T-Stück			
Flußgeschwindigkeit [$\mu\text{l/s}$]	16.7	50	100
$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ Mittelwert	78.7%	73.2%	61.2%
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ Mittelwert	21.3%	26.8%	38.8%
Standardabweichung	3.3%	1.8%	0.4%

Tabelle 6-1 Mittelwert und Standardabweichung des Mischungsverhältnisses im Aufbau mit HPLC-Pumpe und T-Stück.

Mit diesem Aufbau ist das Mischungsverhältnis weit entfernt von der gewünschten 50:50 Mischung. Diese Abweichung ist bedingt durch unterschiedliche Flußgeschwindigkeiten in beiden Seiten. Da der Fluß nach der Pumpe über ein T-Stück auf die beiden Proben-schleifenventile aufgeteilt wird, handelt es sich um ein System kommunizierender Röhren. Das Verhältnis der Strömungsgeschwindigkeiten ist hier stark abhängig vom Widerstand in den beiden Teilen. Die unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten in den beiden Kanälen führen zu stark unterschiedlichen Konzentrationsverläufen. Das $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -Profil ist aufgrund der kleineren Strömungsgeschwindigkeit deutlich breiter. Durch Öffnen und Schließen einer Verbindung zwischen zwei Kapillarenstücken oder zwischen Kapillare und Mischer läßt sich das Mischungsverhältnis stark verändern. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt liegt darin, daß schon geringe Abweichungen in der Position der Kapillaren gegeneinander zu einer unvollständigen Überdeckung der kleinen Innendurchmesser führen. Auf diese Weise ändert sich der Widerstand in einer Hälfte des Flußsystems, und der Volumenstrom durch diese Seite nimmt ab. Ein System mit nur einer Pumpe ist für die Mischmethode daher nicht geeignet.

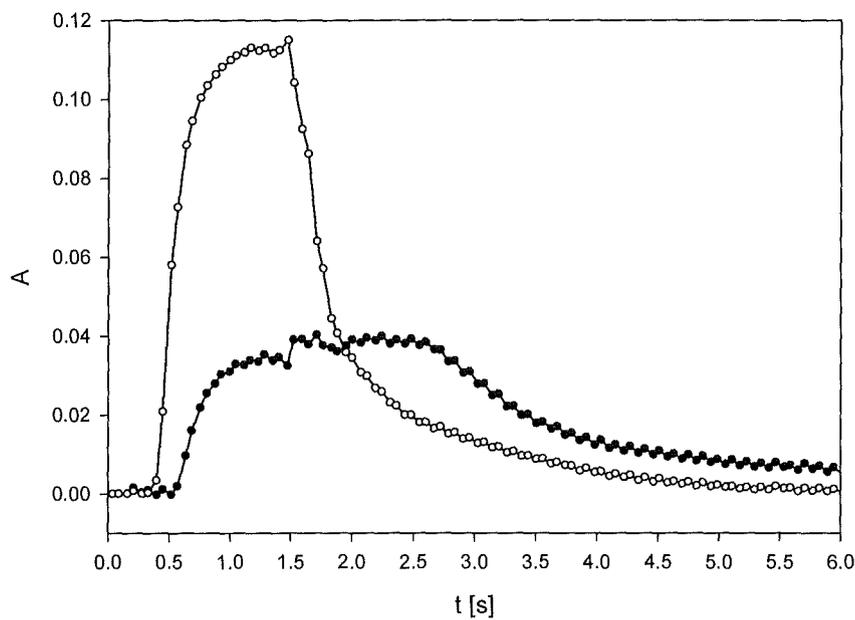


Abbildung 6-4 Strömungsprofil in der Apparatur mit HPLC-Pumpe und T-Stück, $K_4[Fe(CN)_6]$ ○ und $K_3[Fe(CN)_6]$ ●.

Verwendet man hingegen zwei Pumpen, so nimmt bei steigendem Widerstand auf einer Seite zwar der Druckabfall zu, der Volumenstrom und damit die Flußgeschwindigkeit durch diese Seite bleiben aber konstant. In den folgenden Versuchen wurde daher mit einem separaten Antrieb pro Probenschleife gearbeitet. Um anschließend einen Vergleich zwischen 2 Pumpen/2 Motoren und 2 Pumpen/1 Motor durchführen zu können, ist der Einsatz von Spritzenpumpen nötig, da eine HPLC-Pumpe einen solchen Umbau nicht zuläßt.

6.2.2 Zwei Spritzenpumpen und T-Stück

Ersetzt man die HPLC-Pumpe durch zwei Spritzenpumpen, dann wird die 50:50 Mischung annähernd erreicht (siehe Tabelle 6-2). Die Abweichungen vom idealen Mischungsverhältnis bei niedriger Flußgeschwindigkeit läßt sich durch eine unvollständige Mischung erklären. Ist der Zellinhalt nicht homogen, sondern liegen die beiden Lösungen teilweise getrennt nebeneinander vor, kann es zu Abweichungen der gemessenen Konzentrationen kommen. Mit zunehmender kinetischer Energie der Ströme, d. h. zunehmender Flußgeschwindigkeit verbessert sich die Mischung. Dies stimmt mit dem erwarteten Mischverhalten eines konvektiv arbeitenden Mischers überein.

2 Spritzenpumpen und T-Stück				
Flußgeschwindigkeit [$\mu\text{l/s}$]	8.3	16.7	50	100
$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ Mittelwert	45.2%	46.8%	50.0%	49.6%
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ Mittelwert	54.8%	53.2%	50.0%	50.4%
Standardabweichung	2.1%	0.9%	0.5%	0.5%

Tabelle 6-2 Mittelwert und Standardabweichung des Mischungsverhältnisses im Aufbau mit zwei Spritzenpumpen und T-Stück.

Bei Strömungsgeschwindigkeiten größer als $50 \mu\text{l/s}$ erhält man eine 50:50 Mischung. Eine Standardabweichung von $\pm 0.5\%$ ist allerdings für die Differenzspektroskopie immer noch unakzeptabel groß. Da die Differenzsignale häufig nur ca. 1% der Gesamtabsorption des Proteins ausmachen, sollte die Standardabweichung 0.25% nicht überschreiten. Sonst sind die durch die Konzentrationsänderung entstehenden Störungen größer als die zu messenden Differenzbanden.

6.2.3 Zwei Spritzenpumpen und Mikromischer

Um den Einfluß unterschiedlicher Mischsysteme auf die Reproduzierbarkeit zu untersuchen, wurden Versuche mit einem diffusiv mischenden Mikromischer durchgeführt. Das Prinzip dieses Mixers ist in Abbildung 6-5 dargestellt.

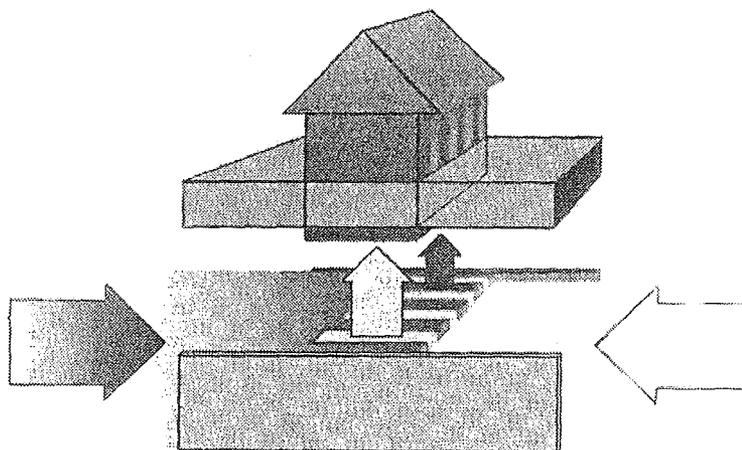


Abbildung 6-5 Prinzip des diffusiven Mikromischers (Ehrfeld et al. 1999).

Die beiden Ströme werden in lamellenförmige Schichten aufgeteilt und strömen gegeneinander, so daß sich die Schichten der beiden Lösungen abwechseln. Da die Dicke der Schichten nur $40 \mu\text{m}$ beträgt, ist die Diffusionszeit klein genug, um eine gute Mischung zu gewährleisten.

Mit diesem Mischelement erhält man innerhalb der Fehlergrenzen eine 50:50 Mischung der beiden Lösungen (Tabelle 6-3). Allerdings ist auch hier die Standardabweichung für die Differenzspektroskopie zu groß.

2 Spritzenpumpen und Mikromischer		
Flußgeschwindigkeit [$\mu\text{l/s}$]	8.3	50
$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ Mittelwert	50.6%	49.9%
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ Mittelwert	49.4%	50.1%
Standardabweichung	0.3%	0.5%

Tabelle 6-3 Mittelwert und Standardabweichung des Mischungsverhältnisses im Aufbau mit zwei Spritzenpumpen und Mikromischer.

Aus der Unabhängigkeit der Standardabweichung vom verwendeten Mischer läßt sich schließen, daß sich die noch vorhandenen Abweichungen im Mischungsverhältnis zwischen den einzelnen Versuchen evtl. auf Unregelmäßigkeiten in der mechanischen Bewegung der Pumpe zurückführen lassen. In der folgenden Versuchsreihe wurde daher nur eine der beiden Spritzenpumpen mit einem eigens konstruierten Aufsatz benutzt, der zwei Spritzen gleichzeitig aufnehmen kann. So wirken sich mechanische Abweichungen im Antrieb auf beide Spritzen gleichzeitig aus.

6.2.4 Doppelspritzenpumpe und T-Stück

Die mit diesem System erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 6-4 dargestellt. Die Standardabweichung ist gegenüber den Versuchen mit getrennten Spritzenpumpen halbiert. Man erkennt auch hier deutlich den Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit. Die Strömungsgeschwindigkeit ist daher in Bezug auf Mischung einerseits und höherem Druckabfall andererseits zu optimieren, da durch die höhere Flußgeschwindigkeit die Abweichungen in der Schichtdicke größer werden.

Doppelspritzenpumpe und T-Stück			
Flußgeschwindigkeit [$\mu\text{l/s}$]	16.7	50	100
$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ Mittelwert	49.4%	50.0%	49.8%
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ Mittelwert	50.6%	50.0%	50.2%
Standardabweichung	0.6%	0.2%	0.2%

Tabelle 6-4 Mittelwert und Standardabweichung des Mischungsverhältnisses im Aufbau mit Doppelspritzenpumpe und T-Stück.

6.3 Vergleich der verschiedenen Systeme

Ein Vergleich der unterschiedlichen Systeme ist in Abbildung 6-6 zu finden. Die Verwendung von einer Pumpe für beide Lösungen erweist sich für diese Vorgehensweise als ungeeignet. Aufgrund des Systems kommunizierender Röhren kann eine 50:50 Mischung nicht erreicht werden, da bei geringen Unterschieden im Flußwiderstand die Strömungsgeschwindigkeit in beiden Seiten zu unterschiedlich ist. Die Verwendung von zwei Pumpen mit zwei Motoren führt zu einem 50:50 Verhältnis. Die Standardabweichungen sind aber aufgrund von mechanischen Schwankungen der beiden Pumpenantriebe noch zu groß, um eine ausreichende Genauigkeit der Proteinabsorption zu erreichen. Erst durch die Verwendung von nur einem Antrieb für beide Spritzen erhält man eine ausreichende Genauigkeit.

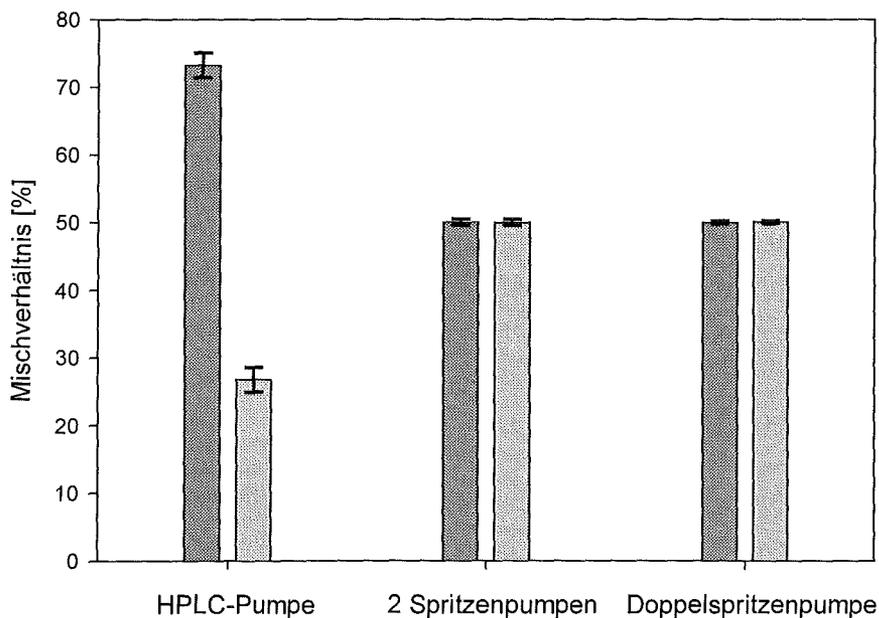


Abbildung 6-6 Vergleich des Mischungsverhältnisses und der Standardabweichungen für die unterschiedlichen Systeme (jeweils mit dem T-Stück als Mischer).

Vergleicht man die beiden unterschiedlichen Mischer, so zeigt sich, daß mit beiden eine ausreichende Mischung erzielt werden kann. Bei Verwendung des T-Stücks wird die Qualität der Mischung jedoch, wie bei einem konvektiv arbeitenden Mischer zu erwarten, mit steigender Flußgeschwindigkeit größer. Das T-Stück ist aufgrund seiner kommerziellen Verfügbarkeit dem Mikromischer vorzuziehen. Ist es jedoch nötig, wegen der Druckempfindlichkeit des Proteins oder der hohen Viskosität der Lösung bei großen Proteinen mit geringeren Flußgeschwindigkeiten zu arbeiten, muß der Mikromischer verwendet werden. Nur dieser führt auch schon bei kleinen Flußgeschwindigkeiten zu einer ausreichenden Mischung der beiden Komponenten.

6.4 Messungen mit der Mischmethode

Die in Kapitel 4.5 beschriebenen Versuche haben gezeigt, daß mittels FTIR-Differenzspektroskopie zwischen bindenden und nicht-bindenden Substanzen unterschieden werden kann. Dabei führt die Komplexbildung des Proteins mit einem Liganden zu einem charakteristischen Differenzspektrum.

Um das beschriebene Verfahren der Mischmethode besser bewerten zu können, soll die Komplexbildung zwischen Trypsin und Benzamidin mit der Mischmethode untersucht und mit den in Kapitel 4.5.1 beschriebenen Spektren verglichen werden (siehe Abbildung 6-7).

Dazu wurden Lösungen von Trypsin und Benzamidin mit einer Konzentration von 6 mM verwendet. Die Spektren wurden, wie in Kapitel 5.2 beschrieben, aufgenommen und das Differenzspektrum berechnet.

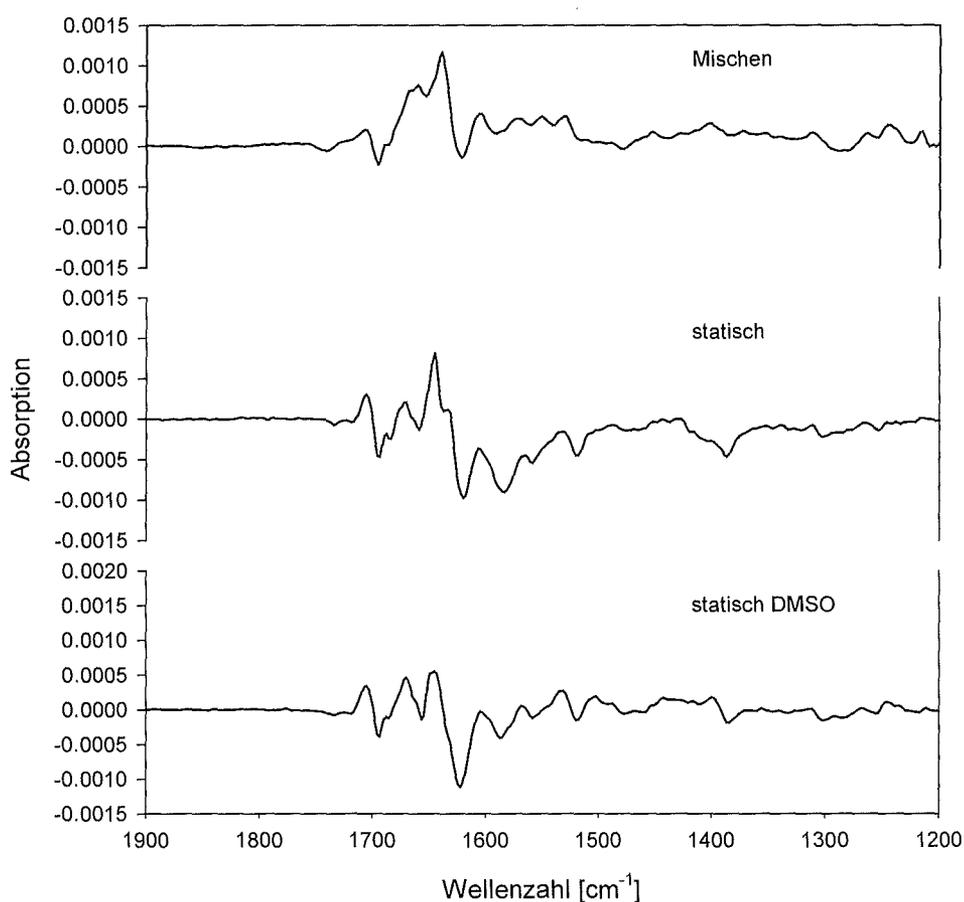


Abbildung 6-7 Vergleich des mittels der Mischmethode (oben) gemessenen Differenzspektrums der Komplexbildung von Trypsin mit Benzamidin mit den Spektren der statischen Versuche ohne (Mitte) und mit (unten) DMSO.

Die Lage der Hauptbanden stimmt in allen drei Spektren überein. Die Bande bei 1518 cm⁻¹ ist in dem Spektrum aus der Mischmethode jedoch nur als schwache Schulter zu erkennen.

Ebenso erscheint das Signal bei 1381 cm^{-1} deutlich schwächer. Im obersten Spektrum scheint außerdem ein geringfügiger Konzentrationsfehler zu den Abweichungen beizutragen. Dieser führt zu breiten positiven Banden bei 1638 und 1540 cm^{-1} , die von der Amid I bzw. Amid II Bande stammen und mit den Differenzbanden überlagert sind. Außerdem müssen im Spektrum der Mischmethode alle Banden, zu denen die Autolyse des Trypsins beiträgt deutlich kleiner sein, da die Inkubationszeit des Inhibitors mit Trypsin deutlich kleiner ist. Diese entspricht der Zeit in der in der ungehemmten Referenz die Autolyse abläuft. Die Hauptbanden der Autolyse liegen, wie in Kapitel 4.4 beschrieben, bei 1636 , 1583 und 1389 cm^{-1} . Vor allem das Fehlen der negativen Absorption bei 1583 und 1389 cm^{-1} ist in der Abbildung 6-7 deutlich zu sehen.

Die Mischmethode scheint daher im wesentlichen die selben Ergebnisse zu liefern wie die Vorversuche. Allerdings sind auch in dieser Messung die Schwierigkeiten mit der Konstanz der Proteinkonzentration in der Zelle und damit mit der Reproduzierbarkeit des Mischungsverhältnisses erkennbar. Die gemessene Standardabweichung von 0.2% für das optimale System ist zwar ausreichend, jedoch nahe an der Grenze des akzeptablen Bereichs. Weitere Verbesserungen sind hier erstrebenswert.

7 Drei-Kammer-Zelle: Realisierung und Ergebnisse

7.1 Anforderungen

Eine weitere Möglichkeit, die Messungen zu automatisieren, ist die Drei-Kammer-Zelle. Die in dieser Arbeit zu realisierende Zelle muß folgende Anforderungen erfüllen. Der Werkstoff für die Zelle muß beständig gegen Wasser sein. Außerdem muß er im Bereich von 1900-1200 cm^{-1} ausreichende Transparenz für infrarote Strahlung besitzen. Silizium bietet die gewünschte Transparenz und ist darüber hinaus für Mikrostrukturierung besonders geeignet.

Um die Funktion des neuen Zellkonzepts sicherzustellen, sollte die Schichtdicke der Kammer für die Mischung zwischen 10 und 12 μm betragen. Die Schichtdicken der beiden Kammern vor der Mischstelle müssen mit einer sehr hohen Genauigkeit halb so groß wie die der Kammer nach der Mischstelle sein. Eine dadurch vorgegebene Strukturtiefe von 5-6 μm läßt sich mit konventionellen Ätztechniken für Silizium gut realisieren, während es für CaF_2 , das zwar in Bezug auf die optischen Eigenschaften (Transparenz auch im sichtbaren Bereich und geringere Verluste durch Reflexion) vorzuziehen ist, keine Standardverfahren für die Strukturierung gibt. Eine Verwendung von Spacern zur Einstellung der Schichtdicke kommt wegen der geforderten hohen Genauigkeit nicht in Frage. Die verwendeten, handelsüblichen Spacer, deren Dicke mit 12 μm angegeben ist, führen beim Zusammenschrauben der Zelle zu Schichtdicken zwischen 10 und 12 μm . Generell sollten alle Kammern der Zelle in einem Schritt strukturiert werden, um die hohe Genauigkeit der Schichtdicke einzuhalten.

Aufgrund der Forderung nach einem geringen Probenverbrauch sollte das Volumen der Zelle möglichst gering sein. Die Miniaturisierung ist dabei durch den Durchmesser des IR-Strahls (bei Verwendung eines Strahlkondensators ca. 3 mm) und die Größe der notwendigen Anschlüsse für das Flußsystem eingeschränkt.

Die für die Fertigung der Zelle verwendeten Verfahren der Mikrosystemtechnik werden im Folgenden näher beschrieben.

7.2 Design der Maske

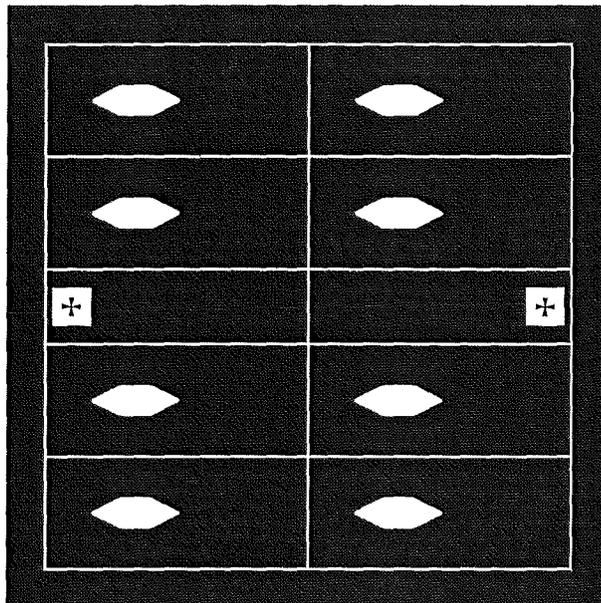


Abbildung 7-1 Maske für die Strukturierung der Wafer (Maßstab 1:1).

Die für die Strukturierung der Zelle entworfene Maske ist in Abbildung 7-1 dargestellt. Jede Zelle wird, wie in Abbildung 7-2 gezeigt, aus vier Einzelteilen zusammengesetzt. Dabei dienen zwei Teile als Kammer für je eine Ausgangsverbindung. Die gemeinsame Kammer, die die doppelte Schichtdicke besitzen soll, wird durch Aufeinanderlegen von zwei Teilen erzeugt. Die Verbindung der beiden Kammern erfolgt durch Bohrungen. Auf diese Weise lassen sich aus einem Wafer zwei Zellen herstellen.

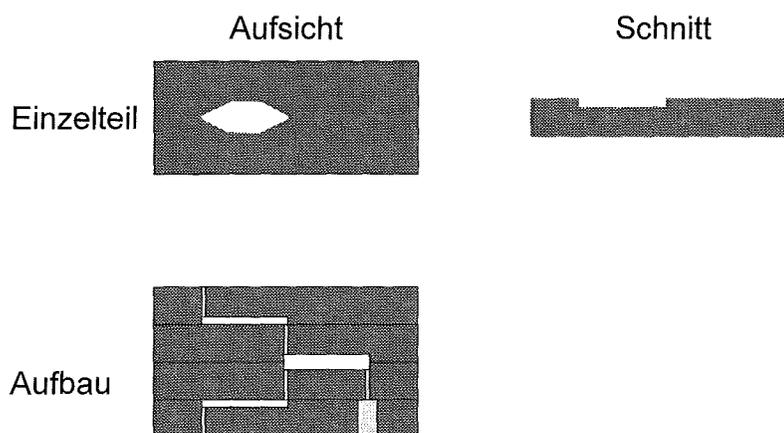


Abbildung 7-2 Aufbau einer Zelle aus vier Einzelteilen. Die Bohrungen zur Verbindung der Kammern sind ebenfalls gezeigt.

7.3 Vorgehensweise bei der Siliziumstrukturierung

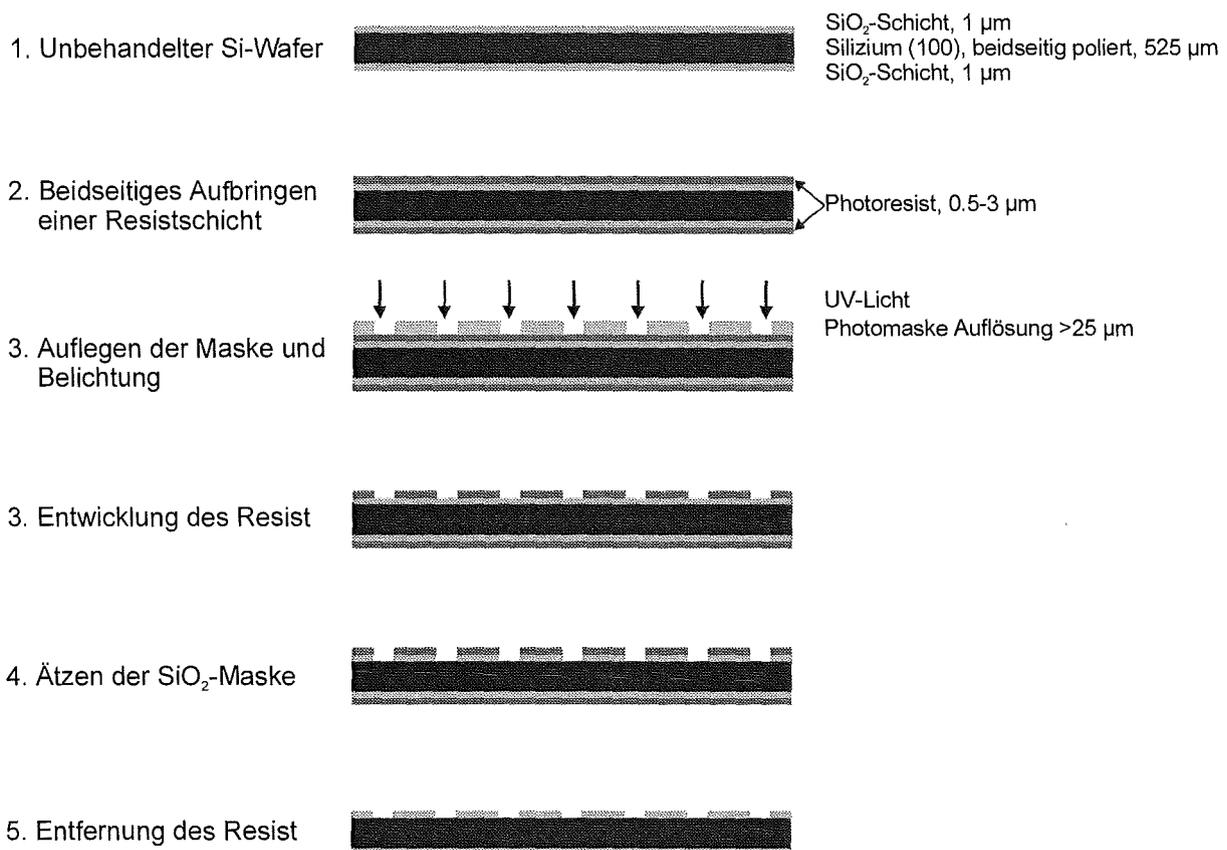


Abbildung 7-3 Vorgehensweise bei der optischen Kontaktbelichtung zur Strukturierung der Oxidschicht.

Die Vorgehensweise bei der Strukturierung von Wafern mittels mikrosystemtechnischer Methoden ist in Abbildung 7-3 dargestellt. Ausgangsmaterial ist ein handelsüblicher Wafer mit einem Durchmesser von 101.6 mm (4") und der Orientierung (100). Dieser ist zur Verringerung der Reflexionen beidseitig poliert und beidseitig mit einer 1 μm dicken Oxidschicht überzogen, die als Maskenmaterial für Siliziumätzprozesse dient. Vor dem Ätzen des Siliziums muß die oben gezeigte Maske auf die Oxidschicht übertragen werden. Dies geschieht mit der optischen 1:1 Kontaktbelichtung (Menz u. Mohr 1997), die im Folgenden beschrieben ist.

Auf den Wafer wird mittels einer Schleuderbeschichtung beidseitig eine Schicht aus einem photosensitiven Lack aufgebracht. Dieser läßt sich durch Belichtung mit UV-Licht über die Maske und anschließende Entwicklung mit verdünnter Kaliumhydroxidlösung strukturieren. Man erhält ein Positivabbild der Maske im Lack.

An den mit Photolack nicht beschichteten Stellen läßt sich nun die Oxidschicht mit Hilfe von wäßriger, gepufferter, 10 prozentiger Flußsäure entfernen. Die Struktur ist nun auf die Oxidschicht übertragen. Im letzten Schritt wird die Photolackschicht entfernt.

7.4 Ätzverfahren für Silizium

7.4.1 Grundlagen

Bei den in der Siliziumtechnologie eingesetzten Ätztechniken unterscheidet man grundsätzlich zwischen naßchemischen und trockenchemischen sowie isotropen und anisotropen Verfahren. Zusätzlich wird das trockenchemische Ätzen in reaktive und nicht-reaktive Prozesse unterteilt. Bei nicht-reaktiven Verfahren werden Inertgase, beim reaktiven Trockenätzen halogenhaltige Gase eingesetzt.

Beim isotropen Ätzen erfolgt der Ätzangriff in alle Raumrichtungen des Siliziumwafers gleich. Anisotrope Prozesse zeigen jedoch in Richtung einer Kristallorientierung ein schnelleres Fortschreiten. Als Maß gilt der Anisotropiefaktor A (siehe Gleichung 7-1).

$$A = 1 - \frac{x}{y}$$

Gleichung 7-1 *Definition des Anisotropiefaktors A. x: Breite der Unterätzung; y: Strukturtiefe.*

$A = 1$ bedeutet eine ideale Anisotropie, dabei wird eine Unterätzung der Ätzmaske vermieden. Dagegen bedeutet $A = 0$ eine ideale Isotropie. Aufgrund der großen Breite bzw. Länge der Kammern relativ zu der geätzten Tiefe ist es bei der Fertigung der Zelle unwesentlich, ob ein isotropes oder ein anisotropes Ätzverfahren gewählt wird.

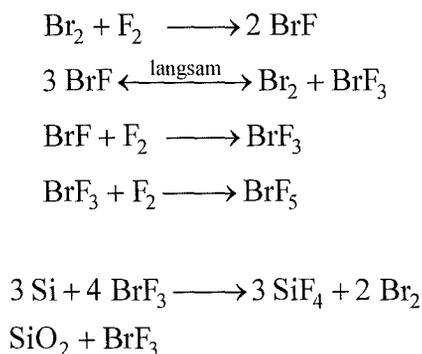
Bei der Beurteilung der unterschiedlichen Ätzverfahren spielt auch die Selektivität gegenüber unterschiedlichen Materialien eine wichtige Rolle. Während des Ätzvorganges darf das Maskenmaterial, in der Regel Siliziumdioxid, nicht oder nur in geringem Maße angegriffen werden. Bei chemischen Verfahren wird die Selektivität durch das Ätzmedium bestimmt. Physikalische, nicht-reaktive Verfahren besitzen normalerweise nur eine geringe Selektivität, da der Sputtervorgang jedes Material angreift. Durch die unterschiedlichen Abtragungsgeschwindigkeiten wird die maximal erreichbare Strukturtiefe bestimmt.

7.4.2 Reaktives Trockenätzen mit Brom- Fluorgas

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verfahren des reaktiven Trockenätzens mit Fluor und Bromgas verwendet (Köhler et al. 1995; Köhler et al. 1996). Die hohe Reaktivität der Gase mit Silizium führt zu einem isotropen Ätzprofil.

Mischungen aus Fluor und Brom reagieren über BrF relativ schnell zu BrF_3 bzw. bei hohen Fluoranteilen von über 50 % zu BrF_5 (siehe Gleichung 7-2). Dabei ist weder eine thermische Anregung noch eine Laserunterstützung notwendig. BrF und BrF_3 sind starke Fluorierungs-

mittel, die mit Silizium zu Brom und SiF_4 abreagieren. Das BrF_3 ist dabei das reaktivste Gas (Ibbotson et al. 1984). 1:3 Mischungen aus Brom und Fluor reagieren fast vollständig zu BrF_3 ab. Das entstandene BrF_3 reagiert mit dem Silizium sofort zu Brom und SiF_4 weiter. Freiwerdendes Brom bildet mit Fluor solange BrF_3 nach bis das gesamte Fluor verbraucht ist. Das Brom nimmt dabei nicht direkt am Ätzprozeß teil sondern wirkt nur als Katalysator. Über die Menge der eingesetzten Gase läßt sich die Ätztiefe bestimmen. Der Gesamtdruck im System wird durch Zugabe von Xenon auf $1.0 \cdot 10^5$ Pa eingestellt. Auf diese Weise läßt sich die Oberflächenrauheit der geätzten Fläche vermindern (Köhler et al. 1996).



Gleichung 7-2 Reaktion beim reaktiven Trockenätzen mit Fluor und Brom.

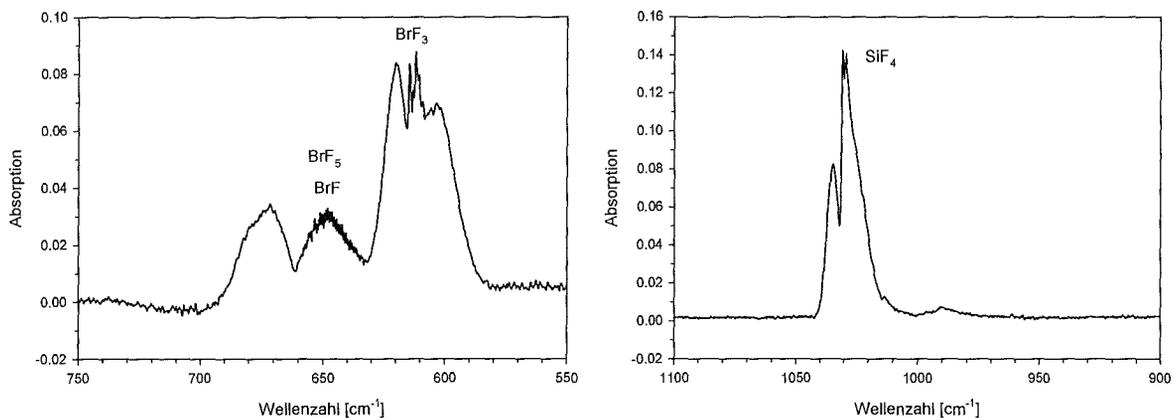


Abbildung 7-4 Charakteristische IR-Banden der Gase BrF_3 , BrF und BrF_5 (links) sowie SiF_4 rechts).

Der Ätzprozeß wird in einer speziellen Edelstahlküvette, die gleichzeitig als IR-Meßzelle dient, durchgeführt (Guber 1986; Köhler et al. 1995). Sie besteht aus einem Rohr aus austenitischem Stahl. Senkrecht zur Längsachse sind zwei Flansche mit AgCl -Scheiben als IR-Fenster angebracht. Die optische Weglänge der Zelle beträgt 200 mm. An der Oberseite der Küvette befinden sich die Anschlüsse für die Gasversorgungsleitungen und für die Druckmessung. Vor der Messung kann die gesamte Küvette über eine Vakuumpumpe evakuiert werden.

Auf diese Weise kann der gesamte Prozeß mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie genau verfolgt werden, da alle Interhalogenverbindungen und SiF_4 charakteristische IR-Banden besitzen (siehe Abbildung 7-4). Aus der Größe dieser Peaks lassen sich die Partialdrücke der entsprechenden Gase berechnen. Der Verlauf der Partialdrücke von BrF_3 und SiF_4 während eines Ätzvorganges ist in Abbildung 7-5 dargestellt.

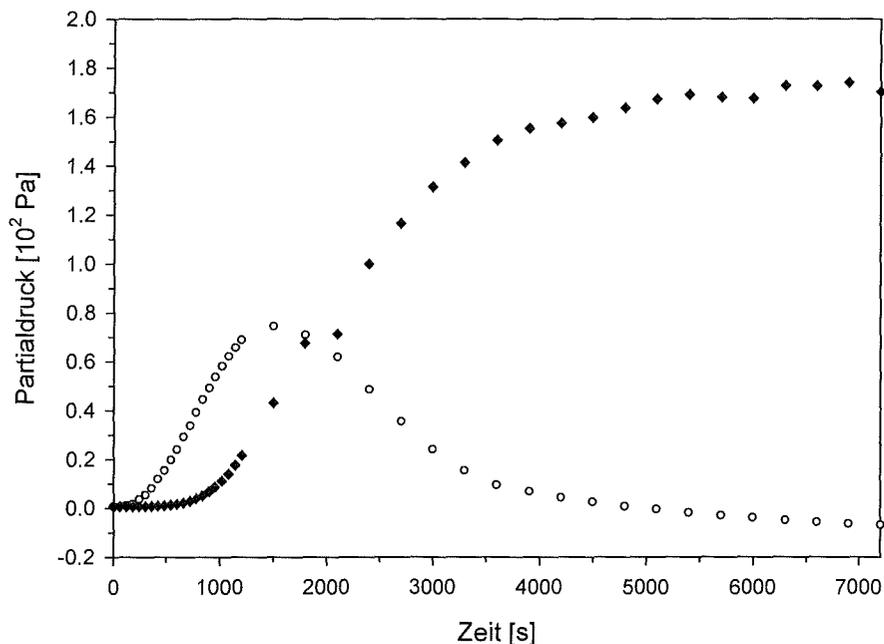


Abbildung 7-5 Verlauf der Partialdrücke für BrF_3 (O) und SiF_4 (◆) während eines Ätzvorgangs mit $2 \cdot 10^2$ Pa Br_2 , $6 \cdot 10^2$ Pa F_2 und $9,92 \cdot 10^4$ Pa Xenon.

Die Ätzrate ist limitiert durch die Diffusion von Ätzgas an die Oberfläche des Wafers und ändert sich daher während des Prozesses. In einer Induktionszeit reagiert Brom mit Fluor zu BrF_3 , anschließend ätzt dieses mit einer annähernd konstanten Rate. Die Reaktion kommt zum Stillstand, sobald das gesamte Fluor verbraucht ist.

Die Selektivität des Prozesses zwischen Silizium und Siliziumdioxid liegt im Bereich von zwei Größenordnungen (Köhler et al. 1996), d. h. Siliziumdioxid wird um einen Faktor 100 langsamer geätzt als Silizium. Bei einer Siliziumdioxidschicht von 1 μm Dicke sind daher 100 μm Strukturtiefe erreichbar.

7.4.3 Ergebnisse der Ätzversuche

Profil der geätzten Struktur

Um das Profil der geätzten Form beurteilen zu können, wurden mit einem Profilometer (Fa. Tencor, Modell P2) Messungen gemacht. Zur Aufnahme des Höhenprofils wird dabei die Oberfläche des auszumessenden Objekts von einer Diamantnadel automatisch abgetastet. Die

Nadelbewegungen werden in elektrische Impulse umgewandelt und mit einem PC aufgezeichnet.

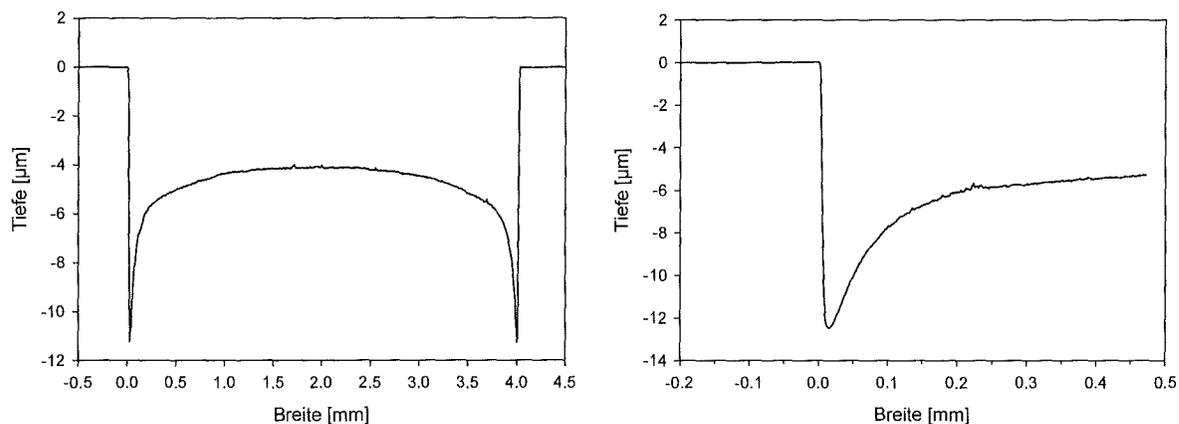


Abbildung 7-6 Profil einer geätzten Fläche (links) mit Vergrößerung des Randbereichs (rechts).

In den Tastschnitt-Profilen der geätzten Bereiche (siehe Abbildung 7-6) ist zu erkennen, daß der Randbereich der Struktur deutlich, d. h. um einen Faktor 2-3, tiefer geätzt ist. Dies führt zu einer Biegung der Oberfläche, die im 3D-Plot (siehe Abbildung 7-7) deutlich sichtbar ist.

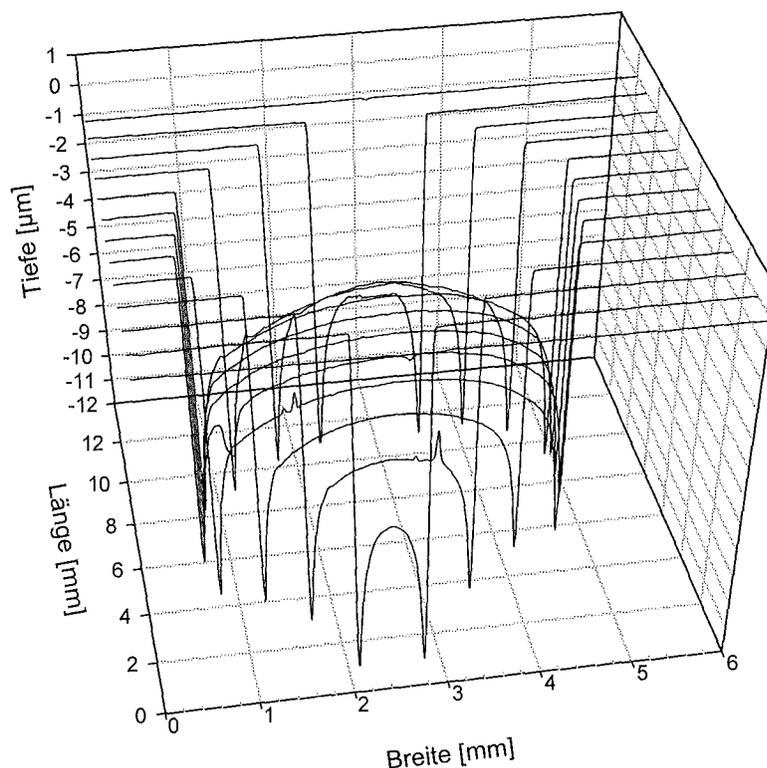


Abbildung 7-7 3D-Tastschnitt-Profil der geätzten Oberfläche.

Dies scheint eine Folge der Diffusionslimitierung des Ätzprozesses zu sein (siehe Abbildung 7-8). In den Bereichen, die mit der SiO_2 -Maske bedeckt sind, wird kein Ätzgas verbraucht. Es kommt zu einer Anreicherung des Ätzgases im Gasraum direkt über der Maske. Dadurch kann in den Randbereich sehr viel mehr Gas nachgeliefert werden. Der Ätzprozeß verläuft schneller, und es kommt zu einer Überätzung. Aus dem selben Grund ist die Strukturtiefe in der Mitte am geringsten, da dort die Diffusionswege am längsten sind. Diese Wölbung der Oberfläche ließe sich wahrscheinlich durch Verwendung eines Sputterätzprozesses vermeiden.

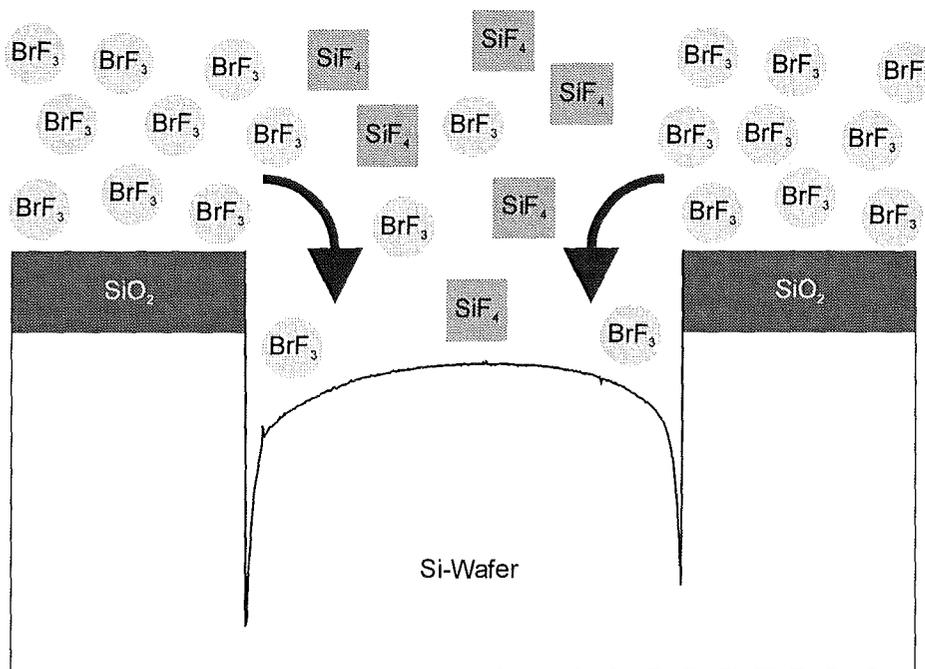


Abbildung 7-8 Entstehung des typischen Ätzprofils aufgrund der Anreicherung von Ätzgas über der Maske.

In der Mikrosystemtechnik spielt dieser Effekt normalerweise keine Rolle, da dort das Verhältnis zwischen Breite und Tiefe der Struktur im Bereich zwischen 1:1 und 10:1 liegt. Bei den hier verwendeten Strukturen liegt aber ein Verhältnis von 1000:1 vor. Daraus resultiert der gewaltige Unterschied in den Diffusionslängen.

Reproduzierbarkeit der Oberflächenprofile

Vergleicht man die Profile unterschiedlicher Rauten eines Wafers (siehe Abbildung 7-9), so zeigt sich eine gute Übereinstimmung. Die resultierenden Abweichungen scheinen eher durch den Fehler der Messung als durch die Unterschiede in den Profilen bedingt zu sein, da negative Abweichungen auf einer Seite des Profils positiven auf der anderen Seite gegenüberstehen. Anhand der Tastschnitt-Profile läßt sich keine Aussage darüber machen, ob die Genauigkeit der Äztiefe der unterschiedlichen Kammern für die FTIR-

Differenzspektroskopie ausreichend ist. In Abbildung 7-9 erkennt man Unterschiede in den Profilen der vier einzelnen Kammern, alle Meßlinien schneiden sich jedoch in einem Punkt. Positive Abweichungen auf einer Seite sind begleitet von negativen Abweichungen auf der anderen Seite der Raute. Die Abweichungen können daher auch auf eine lineare Basislinienverschiebung zurückzuführen sein.

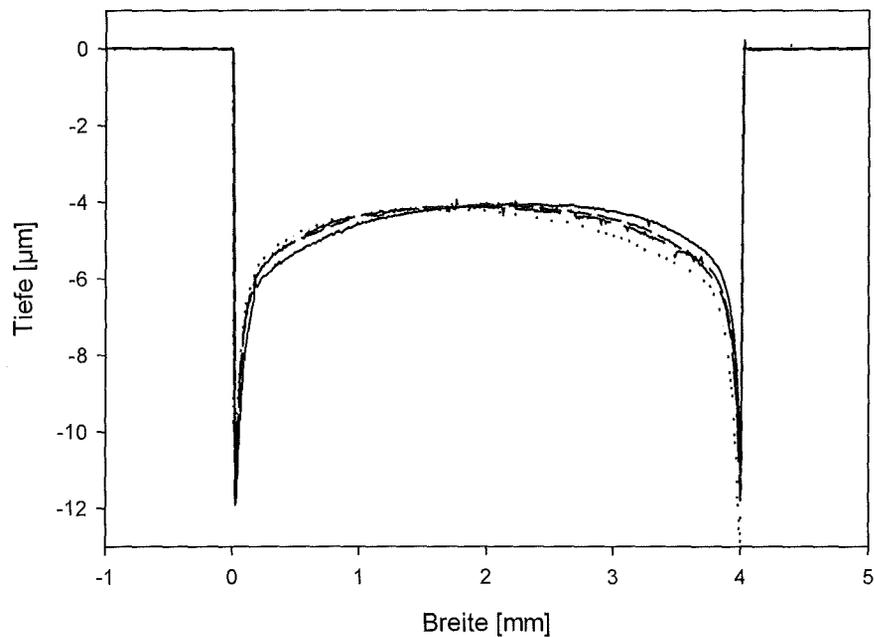


Abbildung 7-9 Vergleich der Tastschnitt-Profile von vier verschiedenen Rauten eines Wafers.

Beschaffenheit der Oberfläche der geätzten Strukturen

Die REM-Aufnahmen (siehe Abbildung 7-10) der geätzten Bereiche zeigen, daß die gewünschten Strukturen sehr gut abgebildet werden. Allerdings zeigen sich auf der Oberfläche stellenweise einige Unebenheiten, deren Ursache noch nicht geklärt ist. Die Erhebungen könnten von Fehlern in der Maske oder Verunreinigungen auf dem Wafer, die als Ätzstopschicht wirken, stammen. Außerdem ist ein lokal schneller (Vertiefungen) oder langsamer (Erhebungen) verlaufender Ätzfortschritt denkbar.

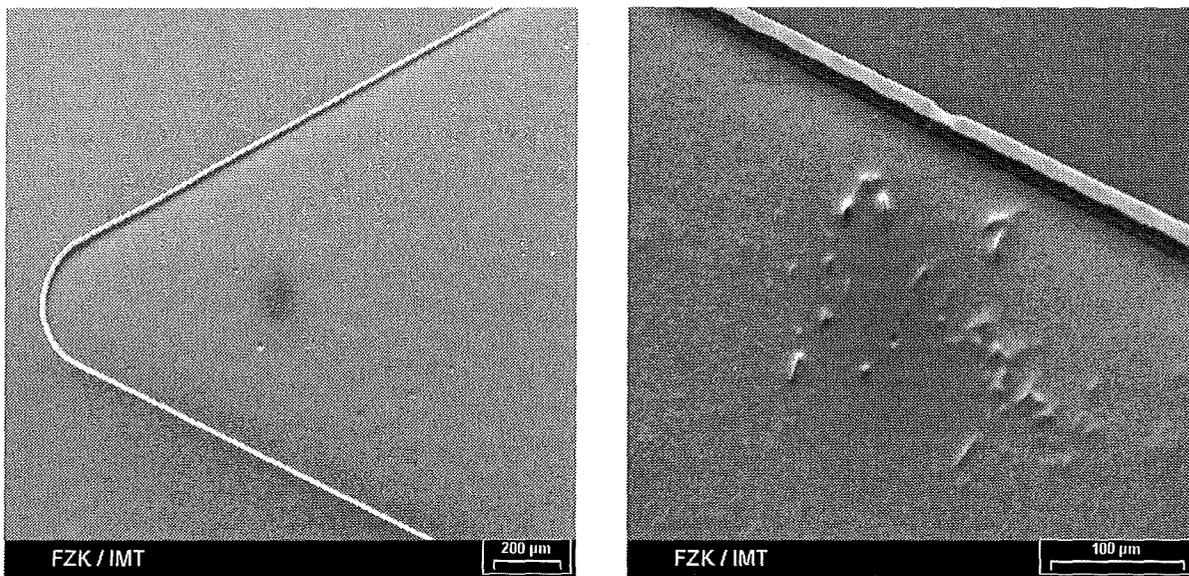


Abbildung 7-10 REM-Aufnahmen der geätzten Strukturen vor dem Entfernen der SiO₂-Maske. Im rechten Bild ist die Unterätzung der Maske zu erkennen. Außerdem erkennt man rechts einige Unebenheiten auf der Oberfläche.

Während des Brom-Fluor-Ätzens bildet sich auf dem Wafer eine schwarze kohlenstoffhaltige Schicht aus. Diese ist chemisch und mechanisch sehr stabil. Eine Entfernung dieser Schicht ist durch chemische Reinigungsverfahren nicht möglich. Sie kann nur durch Sputterätzen im Sauerstoffplasma entfernt werden (Gerlach 1997). Als Ursachen für die Ausbildung dieser Schicht kommen organische Verunreinigungen der Waferoberfläche, wie z. B. Reste des Photolacks, in Frage. Zur Entfernung dieser Verunreinigungen werden die Wafer vor dem Ätzschritt mit H₂O₂:H₂SO₄ (Verhältnis 1:3) 10 Minuten bei 80°C gereinigt. Eine dadurch entstehende dünne Oxidschicht wird anschließend durch kurzes Eintauchen in 10% gepufferte HF entfernt. Allerdings sind auch die eingesetzten Gase durch kohlenstoffhaltige Verbindungen, wie CF₄ und COF₂, verunreinigt, so daß die Ausbildung der schwarzen Schicht nicht vollständig vermieden werden kann.

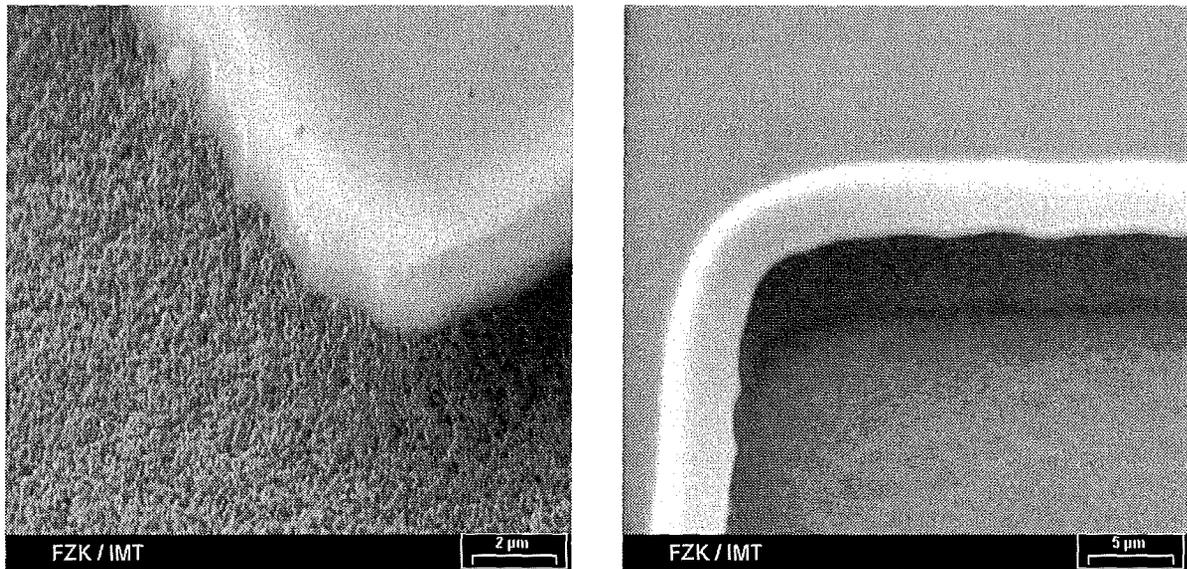


Abbildung 7-11 REM-Aufnahmen der Oberfläche der geätzten Strukturen vor (links) und nach (rechts) dem Sputterätzen im Sauerstoffplasma. Auch die Rauheit der Oberfläche nimmt durch die Entfernung der kohlenstoffhaltigen Schicht ab.

Die in Abbildung 7-11 gezeigten REM-Aufnahmen der Oberfläche zeigen, daß sich die kohlenstoffhaltige Schicht durch Sputterätzen entfernen läßt und gleichzeitig die Rauheit der Oberfläche deutlich abnimmt.

Außerdem ist auch hier die Unterätzung der SiO_2 -Maske zu erkennen. Der Prozeß verläuft annähernd ideal isotrop.

7.5 Laserschneiden der Verbindungskanäle

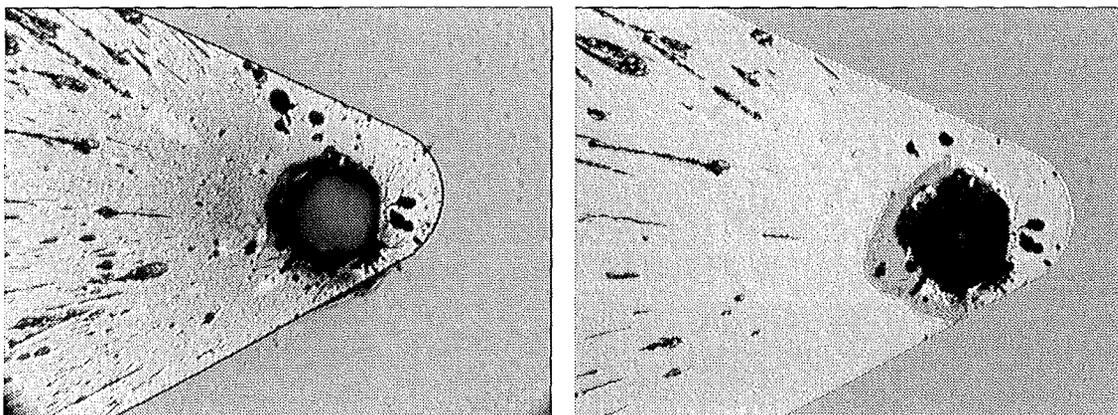


Abbildung 7-12 Löcher durch den Wafer nach dem Bohren (links) und nach dem SiO_2 -Ätzen und der Entfernung der Resistschicht (rechts). Die Stellen außerhalb der Struktur sind frei von heraus geschleuderten Teilchen, und kleinere Teilchen innerhalb der Struktur wurden während des SiO_2 -Ätzens ebenfalls entfernt.

Die einzelnen Kammern innerhalb der Zelle müssen durch Kanäle verbunden werden. Dafür werden mittels Laserschneiden Löcher mit einem Durchmesser von $200\ \mu\text{m}$ in den Wafer gebohrt. Dabei werden allerdings Siliziumteilchen aus dem Loch heraus auf die umgebenden Waferflächen geschleudert. Bleiben solche Teilchen auf der Randfläche der Kammern kommt es bei der Verbindung der Einzelteile der Zelle zu Undichtigkeiten und Veränderungen in der Schichtdicke. Werden die Kanäle nicht in den fertig strukturierten Wafer, sondern bereits nach der Resistentwicklung gebohrt, so wird die Mehrzahl dieser Splitter beim SiO_2 -Ätzen und beim Entfernen des Resists beseitigt. Kleinere Teilchen innerhalb der zu ätzenden Struktur werden ebenfalls entfernt (siehe Abbildung 7-12).

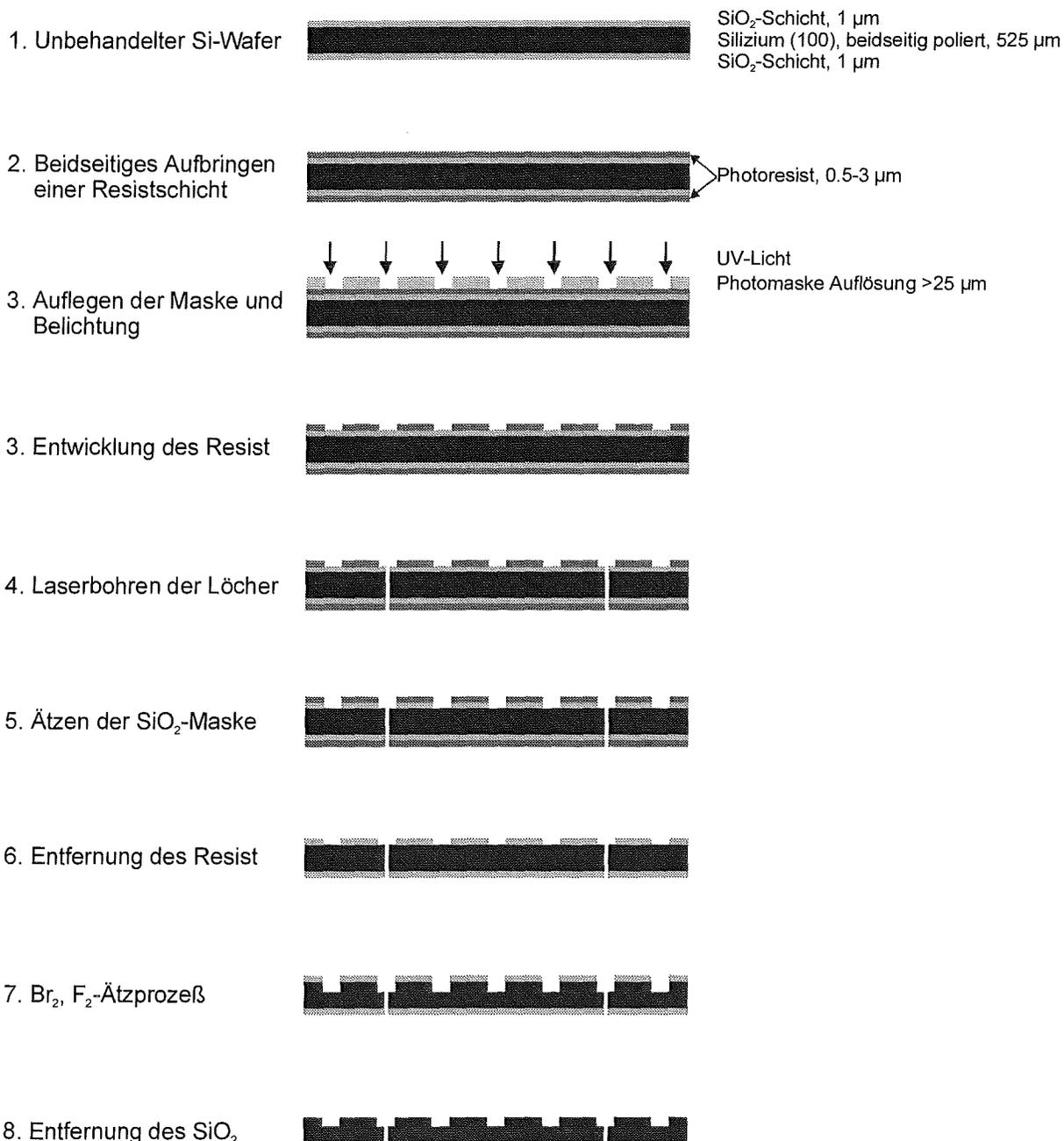


Abbildung 7-13 Gesamter Prozeß zur Strukturierung der Wafer.

Der Gesamt Ablauf des Strukturierungsprozesses sieht daher wie in Abbildung 7-13 dargestellt aus. In das standardmäßige Lithographieverfahren wird das Laserschneiden nach der Resistentwicklung eingefügt. Anschließend wird die Maske wie üblich durch Ätzen mit wäßrigem Fluorwasserstoff in die Siliziumdioxidschicht übertragen.

7.6 Messungen mit der Drei-Kammer-Zelle

7.6.1 Aufbau

Für die Messungen mit der Drei-Kammer-Zelle wurde das Flußsystem mit der Doppelspritzenpumpe (siehe Kapitel 6.1) verwendet. Die Drei-Kammer-Zelle ersetzt dabei Mischer und Zelle. Die einzelnen Siliziumplättchen werden mittels eines Gehäuses zusammengepreßt. Der entsprechende Aufbau ist in Abbildung 7-14 gezeigt.

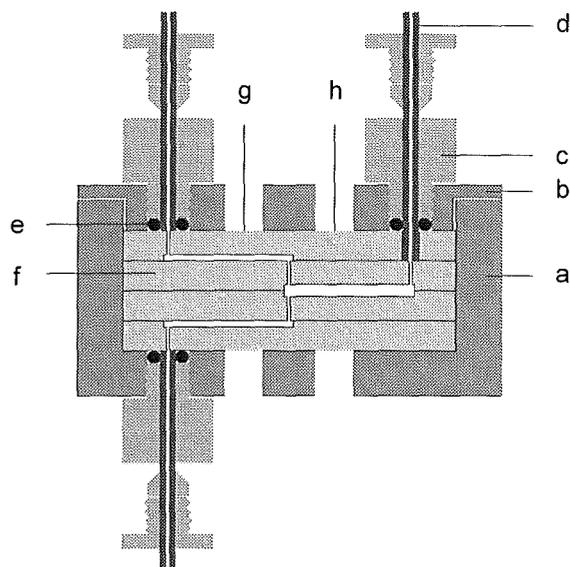


Abbildung 7-14 Zusammengebaute Siliziumzelle mit a: Gehäuse, b: Deckel, c: intern/extern-HPLC-Verbindung, d: Kapillare, e: O-Ring, f: Siliziumplättchen, g: Meßstelle für Summe der Reagenzien, h: Meßstelle für Mischung (nicht maßstabsgetreu).

Die Kapillaren (d) sind über intern/extern-HPLC-Verbindungen (c) in das Gehäuse (a, b) geschraubt. Die Abdichtung gegenüber den Siliziumplättchen (f) erfolgt über O-Ringe (e). Das Gehäuse besitzt Aussparungen von 3 mm Durchmesser (g, h), durch die der IR-Strahl auf die Zelle trifft. Die beiden Meßstellen sind 12 mm auseinander, so daß der IR-Strahl auch ohne Strahlkondensator nur eine der beiden Stellen durchstrahlt. Für die Messungen wird manuell jeweils eine der beiden Meßstellen im IR-Strahl positioniert.

Ein automatisiertes System müßte entweder einen Positioniermechanismus mit ausreichender Genauigkeit besitzen, oder es müßte ein Spektrometer mit Zweistrahl-optik verwendet werden. Die Verwendung einer Zweistrahl-optik ist vorzuziehen, da damit keine Schwierigkeiten bei der Positioniergenauigkeit zu erwarten sind. Eventuelle Abweichungen in der Intensität der beiden Strahlen lassen sich durch Aufnahmen eines Referenzspektrums für jeden Strahl leicht korrigieren. Bei Verwendung einer Positioniereinrichtung muß eventuell vor jedem Spektrum ein Wasserspektrum zur Intensitätskorrektur gemessen werden.

7.6.2 Messungen in den getrennten Kammern

Da für diese ersten Versuche auf eine Verbindung der einzelnen Scheiben der Zelle verzichtet wurde, und auch kein komprimierbarer Spacer, wie bei handelsüblichen, zerlegbaren Zellen, verwendet wurde, kam es leicht zum Austreten von Flüssigkeit zwischen den Lagen. Es konnte daher bei allen Versuchen mit der Siliziumzelle nur mit sehr geringen Flußgeschwindigkeiten gearbeitet werden. Ein wasserdichtes Bonden der einzelnen Siliziumscheiben wäre möglich aber sehr aufwendig. Die Dichtigkeit des in Abbildung 7-14 gezeigten Aufbaus war ausreichend, um die Leistung der Drei-Kammer-Zelle zu testen.

Die Strömungsprofile in den beiden getrennten Kammern sind in Abbildung 7-15 gezeigt.

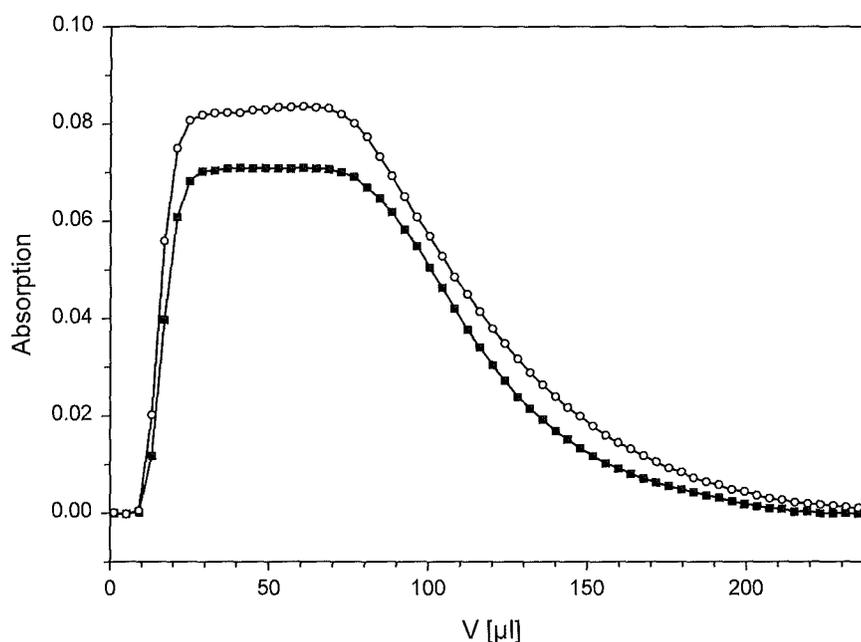


Abbildung 7-15 Strömungsprofile nach dem Einspritzen von jeweils $50 \mu\text{l}$ $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (O) und 0.1 M $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (■) in die getrennten Kammern der Siliziumzelle.

Beide Peaks steigen gleichzeitig an und besitzen ein ausgedehntes Plateau. Auch hier sind die Peaks wegen der unterschiedlichen Verweilzeiten der vorderen und der hinteren Front asymmetrisch.

Analog zu den Mischversuchen wurde auch hier das Verhältnis zwischen den beiden Substanzen und seine Reproduzierbarkeit in den getrennten Kammern untersucht. Es wurden 10 Versuche mit $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ und $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ gemacht. Die Gesamtabsorption wurde bestimmt, indem beide Kammer mit der Lösung gefüllt wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 7-1 dargestellt.

Man erhält ein Verhältnis von 49:51 zwischen den beiden Kammern. Die Standardabweichung ist mit 0,2% ausreichend gut. Die Abweichung von der 50:50 Mischung kann einerseits durch eine Abweichung in der Ätztiefe der beiden Kammern, aber auch durch Partikel zwischen den Siliziumscheiben bedingt sein. Eine Abweichung von 2% in der Schichtdicke entspricht einer Abweichung von 0,1 μm . Diese kann auch durch eine leichte Verschiebung der gebogenen Profile gegeneinander zustande kommen. Da die Plättchen nicht miteinander verbunden sind, kommt es auch hier zu Aufweitungen der Schichtdicke, durch die Wasser zwischen die Lagen eindringen kann. Dies kann ebenfalls zu der beobachteten Abweichung beitragen, da dadurch die beiden Platten nach dem Stoppen des Flusses nicht mehr direkt aufeinander liegen, sondern durch einen Wasserfilm getrennt sind. Wenn dieser Wasserfilm bei den beiden Kammern unterschiedlich dick ist, resultieren verschiedene Schichtdicken.

Si-Zelle Doppelkammer	
Flußgeschwindigkeit [$\mu\text{l/s}$]	3.3
$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ Mittelwert	49.1%
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ Mittelwert	50.9%
Standardabweichung	0.2%

Tabelle 7-1 Mittelwert und Standardabweichung des Verhältnisses zwischen den beiden Lösungen in den getrennten Kammern der Siliziumzelle.

7.6.3 Messungen in der gemeinsamen Kammer.

Ein Strömungsprofil der beiden Lösungen durch die gemeinsame Kammer ist in Abbildung 7-16 gezeigt.

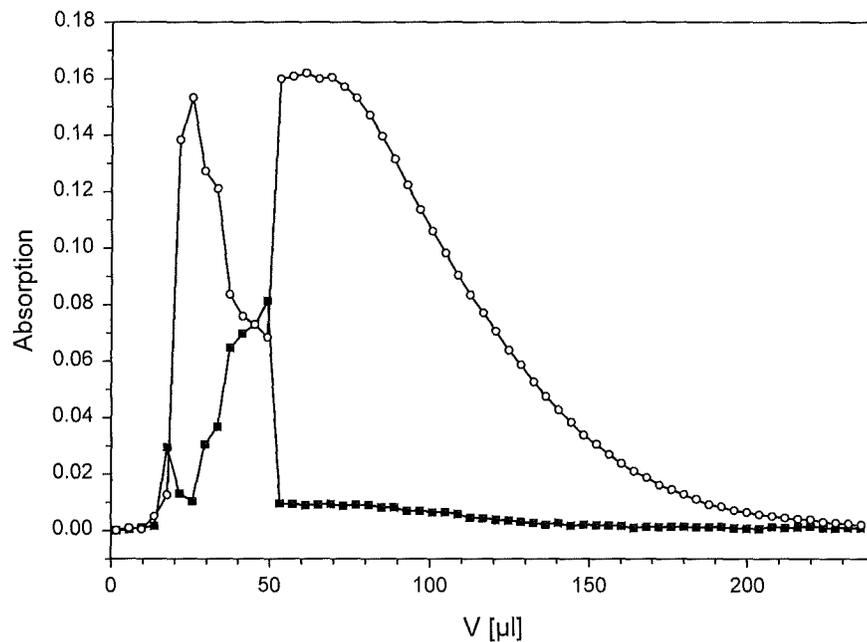


Abbildung 7-16 Strömungsprofile nach dem Einspritzen von jeweils $50 \mu\text{l}$ $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (O) und 0.1 M $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (■) in die gemeinsame Kammer der Siliziumzelle.

Es fließt hauptsächlich $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ durch den vom IR-Strahl durchstrahlten Bereich der gemeinsamen Kammer. Nimmt der Anteil des $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ zu, so sinkt gleichzeitig der des $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Die Lösungen scheinen sich also nicht zu mischen, sondern nebeneinander durch die Kammer zu laufen. Eine mögliche Ursache für dieses Verhalten, bei der vorliegenden laminaren Strömung, kann eine versetzte Lage der beiden Bohrungen sein, durch die die Lösungen in die gemeinsamen Kammer fließen. Liegen diese nicht genau aufeinander, so trifft jede der beiden Lösungen auf das gegenüberliegende Siliziumplättchen und wird rechtwinklig in die Kammer gelenkt. Dabei werden die beiden Lösungen nicht gemischt und fließen anschließend nebeneinander durch die gemeinsame Kammer. Dieses Verhalten ist in Abbildung 7-17 skizziert.

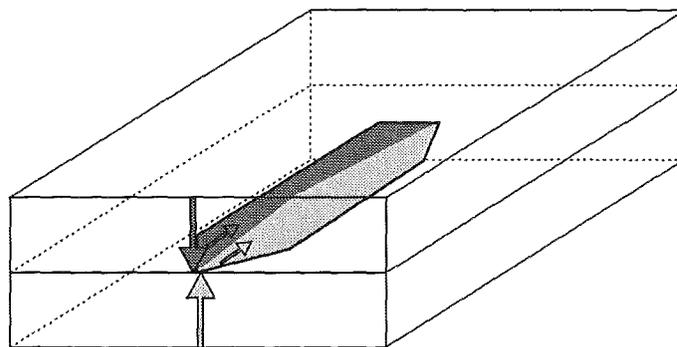


Abbildung 7-17 Skizze der beiden nebeneinander fließenden Lösungen.

7.6.4 Optische Effekte bei der Differenzbildung

Bei der Verwendung der Drei-Kammer-Zelle zur Messung der Differenzspektren kann es zu optischen Effekten kommen, die die Differenzsignale überlagern. Generell wird ein Lichtstrahl beim Übergang von einem optisch dünneren in ein optisch dichteres Medium nicht nur gebrochen, sondern ein Teil der Strahlung wird reflektiert (Gottwald u. Wachter 1997; Kuchling 1991). Der Grad der Reflexion wird dabei durch den Unterschied der beiden Brechzahlen bestimmt. Der Weg eines Strahls durch zwei planparallele Fenster mit Brechzahl n_1 , zwischen denen sich eine Lösung mit Brechzahl n_2 befindet, ist in Abbildung 7-18 dargestellt. Reflexion an den inneren Fensterflächen führt zu einem Teilstrahl D_2 . Die Überlagerung mit dem nicht reflektierten Hauptstrahlungsbündel D_1 führt zur Ausbildung von Interferenzmustern. Konstruktive Interferenz tritt auf, wenn beide Strahlen in Phase sind, d. h. der Unterschied der Weglänge (das Zweifache des Abstands) entspricht einem Vielfachen der Wellenlänge. Dabei wird die Strahlungsintensität verstärkt. Bei gegenphasigem Verhalten kommt es zu destruktiver Interferenz, die Durchlässigkeit erreicht ein Minimum. Dieses Verhalten kann auch zur Bestimmung der Schichtdicke einer Meßzelle verwendet werden.

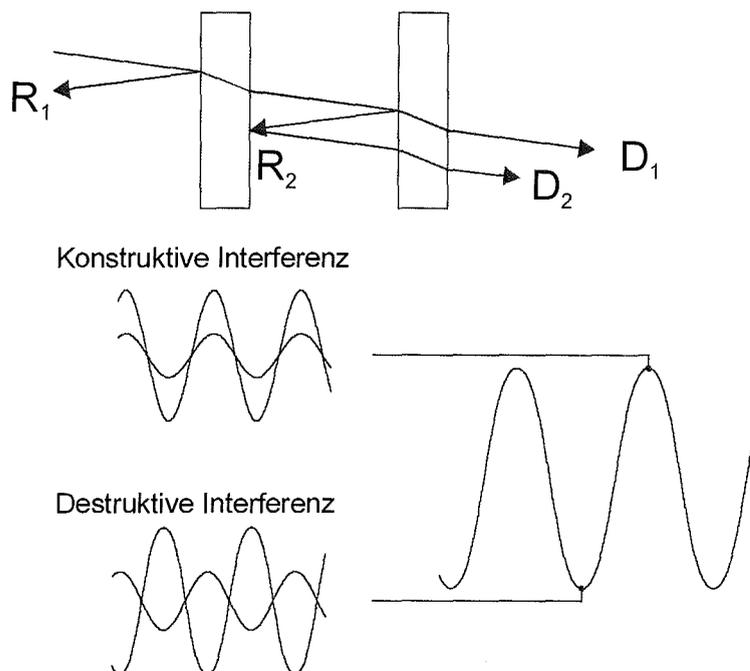


Abbildung 7-18 Weg eines Strahls durch zwei planparallele Fenster. Reflexion führt zu den Strahlen R_1 und R_2 . Die beiden Strahlen D_1 und D_2 überlagern sich. Je nach Wellenlänge und Wegdifferenz kommt es zu konstruktiver oder destruktiver Interferenz.

Verwendet man Silizium ($n_1 = 3.418$) als Fenstermaterial, so ist der Unterschied zu der Brechzahl von Wasser ($n_2 = 1.333$) oder wässrigen Lösungen ($n_2 \approx 1.35$) so groß, daß der Effekt der Interferenz nicht mehr vernachlässigt werden kann.

Bei der Berechnung der Absorption werden die Interferenzen entfernt, solange die Brechzahl der Lösung bei beiden Intensitätsmessungen gleich ist. Ändert sich die Brechzahl, so bleiben die Interferenzen erhalten. Da die Brechzahl einerseits von der Art des gelösten Stoffes und andererseits von der Konzentration abhängig ist, ist nicht auszuschließen, daß die verschiedenen Lösungen, die bei der Differenzspektroskopie von Protein-Ligand-Wechselwirkungen verwendet werden, unterschiedliche Brechzahlen haben.

Die Absorptionsspektren von Acetat-Puffer bei $\text{pH} = 3.8$ mit Wasser als Referenz sind in Abbildung 7-19 gezeigt. Da der Puffer und reines Wasser unterschiedliche Brechzahlen haben, sind im Bereich von $6000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ deutliche Interferenzmuster zu erkennen. Dieser Bereich wird zur Auswertung der Interferenzmuster verwendet, da hier keine störenden Absorptionsbanden auftreten. Bei der gemeinsamen Kammer ist das Muster regelmäßig, da die Reflexion nur in einer Kammer stattfindet. Bei den getrennten Kammern entsteht ein unregelmäßiges Muster, da hier Reflexionen in beiden Kammern stattfinden. Eventuell können auch noch Reflexionen vom hinteren Fenster der zweiten Kammer zum vorderen Fenster der ersten Kammer zu den Interferenzen beitragen.

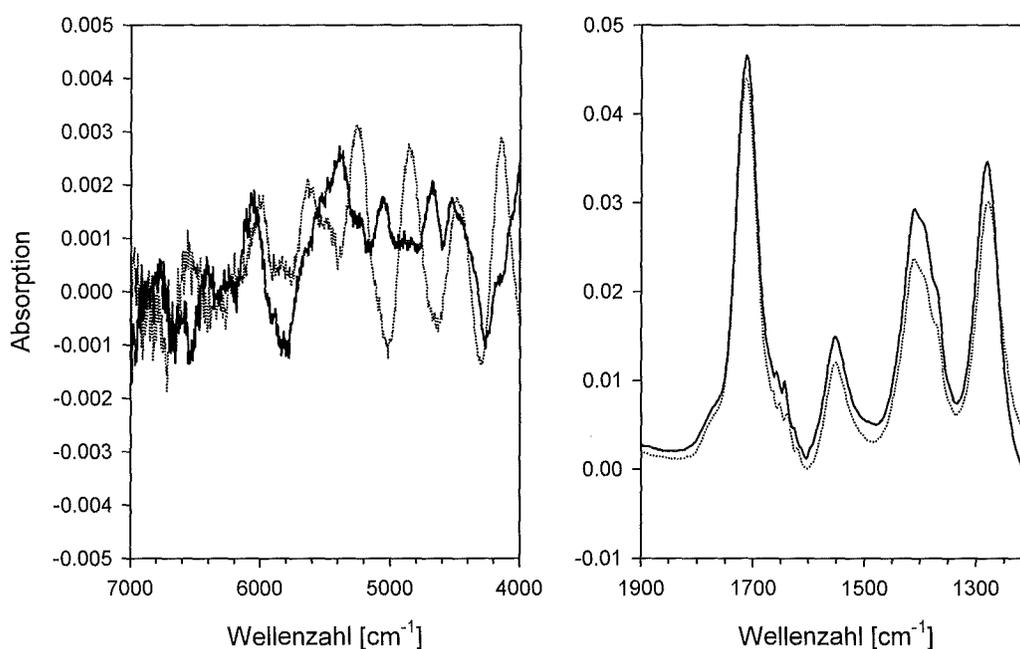


Abbildung 7-19 Absorptionsspektren 0.2 M Acetat-Puffer $\text{pH} = 3.8$ mit Wasser als Referenz in den getrennten Kammern (durchgezogene Linie) und der gemeinsamen Kammer (gepunktete Linie) der Siliziumzelle. Der zur Auswertung verwendete Bereich zwischen 6000 und 4000 cm^{-1} ist links, die Absorptionsbanden sind rechts dargestellt.

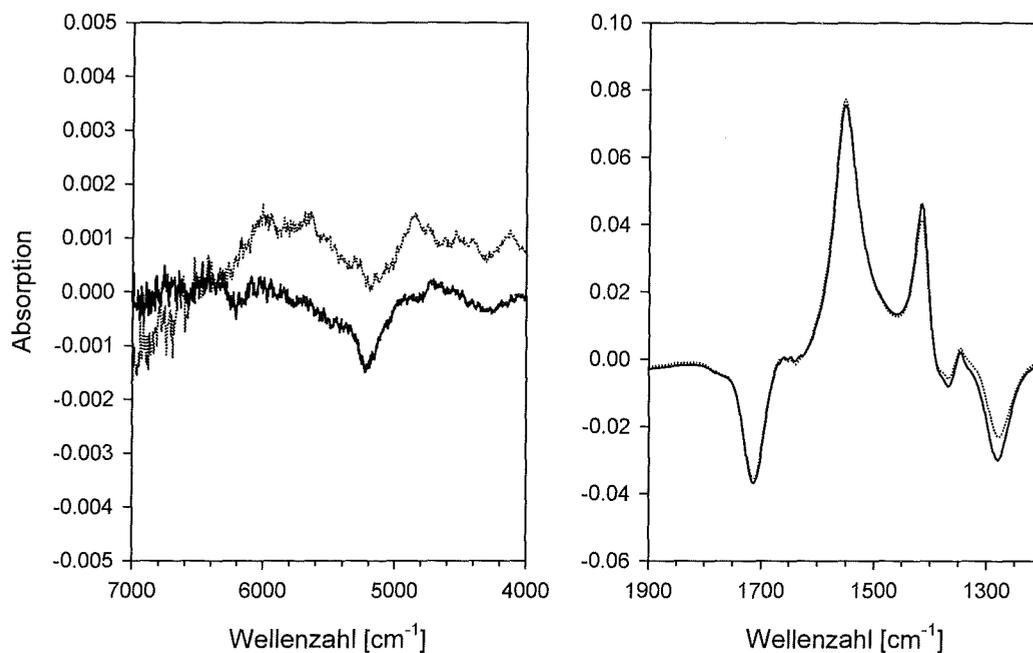


Abbildung 7-20 Differenzspektren von 0.2 M Acetat-Puffer [pH = 5.6]-[pH = 3.8] in den getrennten Kammern (durchgezogene Linie) und der gemeinsamen Kammer (gepunktete Linie) der Siliziumzelle. Der zur Auswertung verwendete Bereich zwischen 6000 und 4000 cm^{-1} ist links, die Differenzbanden sind rechts dargestellt.

Ändert sich die Brechzahl der Lösung nicht, so verkleinert sich die Amplitude der Interferenzmuster. In Abbildung 7-20 sind die Differenzspektren von Acetat-Puffer bei pH = 5.6 gegen Acetat-Puffer bei pH 3.8 gezeigt. Durch die Deprotonierung ändert sich die Brechzahl nicht.

Um kleine Unterschiede in den Interferenzmustern zu erkennen, wird in Abbildung 7-21 die Differenz der beiden Spektren aus Abbildung 7-20 berechnet. Die Amplitude der Interferenzbanden entspricht der bei der Differenzspektroskopie von Protein-Ligand-Wechselwirkungen erwarteten Signalhöhe. Die optischen Effekte sind mit dieser Zelle also zu groß, um Differenzspektren mit ausreichender Genauigkeit zu messen.

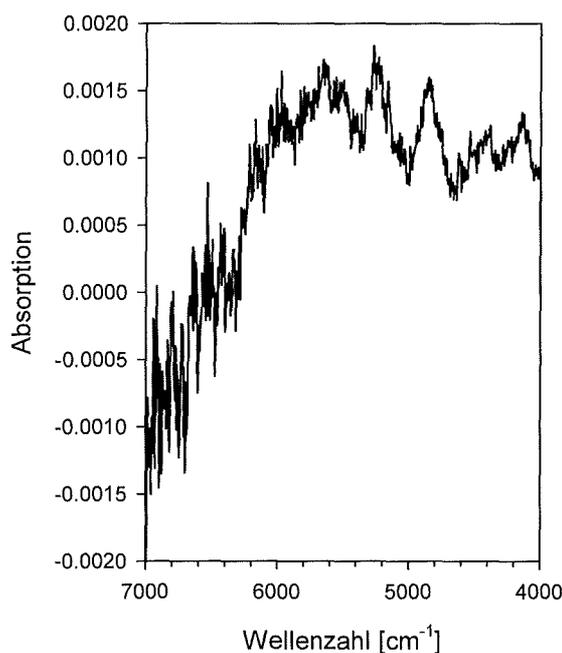


Abbildung 7-21 *Differenz zwischen den Spektren von Acetat [pH 5.6]-[pH 3.8] aus der gemeinsamen Kammer und aus den getrennten Kammern.*

7.7 Schlußfolgerungen

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse mit der Siliziumzelle müßten folgende Verbesserungen vorgenommen werden, um dieses Konzept für ein allgemein anwendbares Verfahren zur Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen einsetzen zu können.

Eine wichtige Modifikation ist die Verbesserung der Dichtheit durch Verbinden der einzelnen Lagen, so daß höhere Flußgeschwindigkeiten eingesetzt werden können. Hier können verschiedene in der Mikrosystemtechnik übliche Methoden zur Verbindung von Silizium eingesetzt werden, wie z. B. das Goldbunden (Shoat u. Feinerman 1994; Tiensuu et al. 1994; Wolffenbittel u. Wise 1994) oder das Silizium-direkt-Bunden (Shimbo et al. 1986; Wiemer u. Herziger 1995). Beim Goldbunden bildet Silizium mit Gold eine eutektische Zwischenschicht, die als Haftschrift dient. Beim Silizium direkt Bunden werden zwei Siliziumwafer, die durch eine chemische Vorbehandlung eine hydrophile Oberfläche erhalten, bei hohen Temperaturen miteinander verbunden. Dabei bildet sich aus dem an der Oberfläche gebundenen Wasser eine dünne Siliziumdioxidschicht, die die beiden Wafer verbindet. Allerdings muß bei diesen Verfahren darauf geachtet werden, daß eine ausreichende Transmission für IR-Strahlung erhalten bleibt oder die durchstrahlten Flächen ausgespart bleiben. Eine Verbindung mittels Klebetechniken ist ebenfalls möglich.

Durch die Verbindung der einzelnen Lagen ist gleichzeitig wahrscheinlich eine Reduktion der Aufweitung der Schichtdicke zu erreichen. Eventuell läßt sich so auch ein 50:50 Verhältnis der beiden Lösungen in den getrennten Kammer erreichen.

Um zu vermeiden, daß die beiden Lösungen nebeneinander fließen, muß beim Laserschneiden der Verbindungslöcher auf eine exakte Positionierung geachtet werden. Bei der hier verwendeten Zelle kann eine Verschiebung der beiden Löcher gegeneinander auch durch eine Lageungenauigkeit der beiden Plättchen verursacht werden. Bei einer verbesserten Zelle sind daher beim Zusammenbau Methoden zu verwenden, die eine genaue Positionierung der beiden Lagen zueinander erlauben. Eventuell könnte auch eine Mischkammer zwischen den beiden getrennten und der gemeinsamen Kammer in die Zelle integriert werden. Um die Notwendigkeit einer solchen Mischkammer abschätzen zu können, müssen die Strömungsverhältnisse beim Eintritt der beiden Lösungen in die gemeinsame Kammer untersucht werden. Dabei wären orts aufgelöste IR-Messungen senkrecht zur Flußrichtung hilfreich.

Der Hauptnachteil, der hier realisierten Drei-Kammer-Zelle, ist allerdings das Auftreten von Interferenzen aufgrund der hohen Brechzahl des Siliziums. Um diese Effekte zu vermeiden, muß die Zelle aus einem anderen Material mit niedrigerer Brechzahl als Silizium hergestellt werden. Empfehlenswert ist ein Material, dessen Brechzahl ungefähr dem von Wasser entspricht. In der Regel wird CaF_2 ($n = 1.434$) als Fenstermaterial für Messungen in wäßrigem Medium verwendet. Um CaF_2 mit ausreichender Genauigkeit zu strukturieren, müßten allerdings neue mikrosystemtechnische Strukturierungs- und Bondverfahren entwickelt werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von präzise hergestellten Zwischenschichten, die als Spacer dienen. Diese müssen mit dem Fenster fest verbunden werden, um das Eindringen von Flüssigkeit zu vermeiden. Um eine Aufweitung der Schichtdicke zu vermeiden, müssen diese Zwischenschichten unkomprimierbar sein, oder ihre Dehnung muß eine kurze Relaxationszeit besitzen.

8 Diskussion der Ergebnisse

Die in den vorausgegangenen Kapiteln dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen mit Hilfe der FTIR-Differenzspektroskopie möglich ist, ohne daß Wechselwirkungsbanden außerhalb des Bereichs der Proteinabsorption (Siebert et al. 1980) liegen müssen bzw. ohne daß maskierte Substanzen (Barth et al. 1991) oder D₂O als Lösungsmittel (White et al. 1995; Swamy et al. 1996) verwendet werden. Die Komplexbindung führt zu gut reproduzierbaren Spektren, während das Differenzspektrum einer Mischung des Proteins mit einer nicht-bindenden Substanz einer Basislinie entspricht.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine nicht automatisierte, universelle Methode zur Untersuchung von Komplexbildungen vorgestellt, die für viele Einsatzmöglichkeiten im Bereich der biophysikalischen Forschung geeignet ist. Mit ihrer Hilfe können Informationen über die Art und den Ort der Bindung von unterschiedlichen Liganden gewonnen werden. Darüber hinaus lassen sich Verdrängungsreaktionen unterschiedlicher Liganden untersuchen. Auf diese Weise können wichtige Hinweise über die Beziehung zwischen Struktur und Funktion eines Proteins sowie über den Übergangszustand bei der Umsetzung eines Liganden gewonnen werden.

Es wurde gezeigt, daß die Methode der statischen Differenzbildung, d. h. der Vergleich zweier Lösungen von Komplex und reinem Protein, entgegen der allgemeinen Literaturmeinung (Mäntele 1993), zu reproduzierbaren Differenzspektren führt. Die Literaturmeinung beruht auf folgenden Annahmen:

1. Die Fertigungstoleranz für zwei Meßzellen mit 10 µm Schichtdicke ist größer als 10 nm und damit zu groß.
2. Das Arbeiten mit nur einer Zelle ist unmöglich, da die Zellfüllung aufgrund des hohen Druckwiderstandes nicht ausgetauscht werden kann.
3. Das Ansetzen von zwei unterschiedlichen Proteinlösungen mit einer zu 0.1% identischen Konzentration ist nicht möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß der Austausch der Zellfüllung trotz des hohen Druckwiderstandes in einer Meßzelle mit 10 µm Schichtdicke möglich ist. Ein geeignetes Flußsystem wurde konzipiert und aufgebaut.

Die Vermeidung von Konzentrationsfehlern ist wesentlich für den Erfolg der Methode, da die Spektren des Ausgangs- und des Endzustands bei dieser Methode nicht mit der gleichen Zellfüllung gemessen werden und da die Differenzsignale teilweise weniger als einem Prozent der Gesamtabsorption entsprechen. Es muß unbedingt gewährleistet sein, daß die durch Konzentrationsfehler auftretenden Banden kleiner sind als die durch die Komplexbildung induzierten

Signale. Dies wird durch die Zugabe des Liganden als hoch (100-fach) konzentrierte Stammlösung erreicht. Eine 0.02% Genauigkeit der Konzentration des Proteins ist damit erreichbar.

Die Amid I Bande ist die Hauptabsorption eines Proteins im Bereich zwischen 1900 und 1200 cm^{-1} . Ihre Intensität ist hauptsächlich abhängig von der Anzahl der Carbonylschwingungen des Peptidrückgrats. Daneben absorbieren auch andere Gruppen in diesem Bereich, diese sind für ca. 10% der Absorption verantwortlich. Die Höhe der Amid I Bande ist damit abhängig von der Zahl der Aminosäuren des Proteins und daher von seiner Größe. Der Fehler im Bereich der Amid I Bande wird mit zunehmender Größe des Proteins kritischer. Dasselbe gilt für den Bereich der Amid II Bande.

Im Gegensatz dazu ist die Größe der durch die Komplexbildung induzierten Signale nicht abhängig von der Größe des Proteins, sondern nur von der Anzahl der Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand. Naturgemäß ist ein größerer Ligand normalerweise in der Lage, eine größere Anzahl von Wechselwirkungen mit dem Protein auszubilden. Außerdem kann die Bildung des Komplexes zu einer Konformationsänderung des Proteins führen. Die Änderungen der intermolekularen Wechselwirkungen haben ebenfalls Differenzbanden zur Folge.

Für die Beurteilung, ob ein Differenzspektrum mit ausreichender Genauigkeit gemessen werden kann, ist das Verhältnis zwischen Signalthöhe der Differenzsignale und der Höhe der durch Konzentrationsfehler verursachten Banden vor allem im Amid I und Amid II Bereich maßgebend.

Die Anwendung auf unterschiedliche Protein-Ligand-Systeme wird durch die Löslichkeit des Liganden bzw. des Proteins in wässrigen Puffersystemen eingeschränkt. Im Gegensatz zu den meisten Proteinen zeigen viele Hemmstoffe in wässrigen Puffersystemen nur eine geringe Löslichkeit, während sie in organischen Lösungsmitteln gut löslich sind. Diesen Zwiespalt versucht man, durch die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels zu umgehen. Bei Messungen mit in Wasser schwer löslichen Substanzen wird am häufigsten DMSO als alternatives Lösungsmittel eingesetzt, da DMSO sowohl Proteine als auch kleine Moleküle mit unterschiedlichsten funktionellen Gruppen löst, vor allem die als Inhibitoren wichtigen Peptide und Peptidmimetika. Allerdings kann die Struktur des Proteins bei Verwendung von DMSO durch Verdrängung von Wasser aus der Hydrathülle verändert werden, da dadurch das Wasserstoffbrückensystem des Proteins beeinflusst wird. Die Aktivität des Proteins und eventuelle Änderungen der Struktur im gewünschten Lösungsmittel sind daher zu testen.

Eine weitere wichtige Voraussetzung für das Verfahren ist die Stabilität des zu untersuchenden Proteins während der Zeit der Meßreihe. Aufgrund der hohen Konzentrationen, die für die FTIR-Spektroskopie verwendet werden müssen, neigen viele Proteine zur Aggregation. Gleiches gilt für die in Kapitel 4.4 beschriebene Autolyse des Trypsins. Diese autokatalytische Zerstörung des Proteins besitzt eine Kinetik zweiter Ordnung und ist daher bei

Konzentrationen von einigen Millimol pro Liter extrem beschleunigt gegenüber den sonst in der Biochemie verwendeten Konzentrationen von einigen Mikromol pro Liter. Eventuell muß die Stabilität des Proteins durch eine Veränderung des Puffers oder durch Zugabe von Hilfsstoffen gesteigert werden. Im Falle des Trypsins war die Unterdrückung dieses, als Kontrollmöglichkeit für die Bindung des Liganden erwünschten, Prozesses durch Zusatz von CaCl_2 möglich.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Möglichkeiten untersucht, die entwickelte Methode für den Einsatz im High-Throughput-Screening der Arzneimittelforschung zu automatisieren. Das entwickelte Verfahren der statischen Differenzspektroskopie ist für das Screening nicht geeignet, da die zu untersuchenden Substanzen als hoch konzentrierte Stammlösungen eingesetzt werden müssen. Dies ist ohne vorangehende Untersuchung der Löslichkeit jeder Substanz nicht möglich. Für das Screening muß daher eine Möglichkeit gefunden werden, Konzentrationen im unteren millimolaren Bereich (typischerweise 5 mM) zu verwenden.

Aufgrund der sehr kurzen Reaktionszeiten ist der Einsatz einer kinetischen Messung nicht möglich. Es muß daher auf andere Vorgehensweisen zurückgegriffen werden. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Alternativen entwickelt und untersucht. Bei der Mischmethode wird das Differenzspektrum aus dem Spektrum einer 50:50 Mischung von Protein und Ligand einerseits und Protein und Puffer andererseits gebildet. Von dem erhaltenen Differenzspektrum muß das getrennt gemessene Spektrum des Liganden anschließend noch subtrahiert werden. Bei den Messungen in der Drei-Kammer-Zelle wird das Differenzspektrum aus der Summe der Spektren von Protein und Ligand in zwei parallelen Kammern und dem Spektrum der Mischung beider Komponenten in einer gemeinsamen Kammer bestimmt.

Der Fehler der durch unterschiedliche Konzentrationen verursacht wird, ist bei der Mischmethode abhängig von der Präzision mit der eine 50:50 Mischung in der Zelle hergestellt werden kann und von der Konstanz der Schichtdicke zwischen den einzelnen Messungen. Bei der Drei-Kammer-Zelle ist der Fehler abhängig von der Übereinstimmung der Schichtdicken der beiden getrennten Kammern untereinander und zugleich mit der Hälfte der Schichtdicke der gemeinsamen Kammer sowie von der Präzision der 50:50 Mischung in der zweiten Kammer. Die Forderung eines konstanten Mischungsverhältnisses gilt für beide Vorgehensweisen. Die Anforderungen an die Drei-Kammer-Zelle sind daher aufgrund der zusätzlich geforderten Genauigkeit der Schichtdicken größer als an die Mischmethode.

Um mit der Drei-Kammer-Zelle Differenzspektren aufnehmen zu können, ist außerdem eine Zweistrahl-optik des Spektrometers nötig. Zur Vermeidung optischer Effekte wäre die Fertigung aus einem Material mit kleinerer Brechzahl als Silizium vorzuziehen. Die Herstellung von Kammern mit ausreichender Übereinstimmung der Schichtdicken in CaF_2 -Fenstern erfordert aber zusätzliche über den Rahmen dieser Arbeit hinaus gehende Entwicklungsarbeit.

Der Nachteil der Mischmethode gegenüber der Drei-Kammer-Zelle liegt darin, daß die Differenzspektren aus vier verschiedenen Spektren berechnet werden. Im Gegensatz zur Drei-Kammer-Zelle, die mit einer Füllung der Zelle auskommt, sind hier vier verschiedene Füllungen der Zelle notwendig. Da bei jeweils zwei Messungen Protein bzw. Ligand nötig sind, verdoppelt sich der Verbrauch an den entsprechenden Lösungen.

Um Schwierigkeiten mit der unterschiedlichen Löslichkeit der im Rahmen des Arzneimittelscreenings untersuchten Substanzen zu reduzieren, werden in der Regel 5 millimolare Lösungen der einzelnen Substanzen in reinem DMSO angesetzt. Unmittelbar vor der Meßreihe werden diese Lösungen verdünnt. Dieses Verfahren hat sich für die meisten Substanzen als geeignet erwiesen. Für FTIR-spektroskopische Messungen müssen die Substanzen in millimolaren Konzentrationen vorliegen. Bei einer Verdünnung auf 1 mM erhält man eine Endkonzentration an DMSO von 10 bzw. 20 Prozent, je nachdem, ob die Proteinlösung mit reinem Puffer oder in Puffer/DMSO angesetzt wird. Beide Vorgehensweisen haben Vor- und Nachteile. Im ersten Fall ist die Endkonzentration von DMSO so niedrig wie möglich, so daß nur geringe Auswirkungen auf die Sekundär- und die Tertiärstruktur des Proteins zu erwarten sind. Durch die Mischung der Proteinlösung mit der Ligandlösung ändert sich jedoch die Lösungsmittelumgebung des Proteins, dadurch können zusätzliche Banden entstehen. Deshalb muß ein Kontrollversuch mit reinem DMSO durchgeführt werden. Das so erhaltene Spektrum wird als Nullwert verwendet. Im zweiten Fall ändert sich die Zusammensetzung des Lösungsmittels durch die Mischung von Protein und Ligand nicht. Einflüsse des Lösungsmittels müssen daher nicht beachtet werden. Die Gesamtkonzentration an DMSO ist aber höher. Dies kann Auswirkungen auf die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des Proteins und damit auf seine Aktivität und die Konformation des aktiven Zentrums haben. Es muß daher sichergestellt werden, daß das Protein in 20% DMSO/Puffer noch in seiner nativen Konformation vorliegt.

Zusammenfassend ist die Untersuchung von Protein-Ligand-Reaktionen mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Verfahren der statischen Differenzbildung möglich. Um die hier konzipierten automatisierbaren Verfahren im Rahmen des Arzneimittelscreenings einsetzen zu können, sind dagegen weitergehende Arbeiten nötig.

9 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines universellen Verfahrens zur FTIR-differenzspektroskopischen Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Um eine möglichst große Universalität zu erreichen, wurde das Verfahren der statischen Differenzbildung eingesetzt. Dabei wird das Differenzspektrum aus getrennten Lösungen von Komplex, Protein und Ligand berechnet. Diese statische Differenzbildung führt zu reproduzierbaren Differenzspektren. Als Lösungsmittel sollen wäßrige Puffersysteme verwendet werden können. Aufgrund der hohen Infrarotabsorption wäßriger Proteinlösungen kann nur mit Schichtdicken kleiner als 12 μm gearbeitet werden.

Um die verschiedenen Lösungen in die Infrarotmeßzelle transportieren zu können, wurde ein Flußsystem aus Probenschleife, Pumpe und Zelle entwickelt und dieses charakterisiert. Der durch die kleine Schichtdicke hervorgerufene hohe Druck bewirkt eine Aufweitung der Zelle während des Pumpens. Nach einer Relaxationszeit von ca. 10 Sekunden ist die Signalstabilität jedoch selbst im Bereich der Wasserbande ausreichend für die FTIR-Differenzspektroskopie. Das parabolische Strömungsprofil des laminaren Flusses in den Zuleitungen führt zu einer störenden Dispersion der Probe. Diese kann durch Reduktion der Innendurchmesser und der Länge der Kapillaren verringert werden. Durch diese Optimierungen wurde ein minimales Probenvolumen von 20 μl erreicht.

An dem Modellsystem Trypsin konnte gezeigt werden, daß eine Unterscheidung zwischen bindenden und nicht-bindenden Substanzen mit Hilfe der statischen FTIR-Differenzspektroskopie möglich ist. Es wurden Differenzspektren mit den bindenden Substanzen Benzamidin, Leupeptin und Propionyl-Leupeptin sowie den nicht-bindenden Kontrollsubstanzen Benzoesäure und Hydrozimtsäure aufgenommen. Diese Differenzspektren, die die Änderungen der Absorptionen von Protein und Ligand zwischen gebundenem und freiem Zustand widerspiegeln, besitzen bei bindenden Substanzen deutliche und reproduzierbare Banden, während nicht-bindende Substanzen zu einer Basislinie führen. Die Signalqualität entspricht der licht- bzw. redoxinduzierten Differenzspektroskopie. Neben einfachen Komplexbildungen können auch Verdrängungsreaktionen FTIR-differenzspektroskopisch beobachtet werden.

Aus den aufgenommenen Spektren können bereits einige Schlußfolgerungen über das molekulare Geschehen bei der Komplexbildung gezogen werden. Die Differenzspektren der verschiedenen Komplexbildungen ähneln einander stark. Die Hauptänderungen scheinen daher Änderungen der Absorptionen des Proteins zu sein. Das Verhältnis zwischen der Amplitude der Differenzbanden und der Gesamtabsorption des Proteins zeigt, daß die Komplexbildung nur mit kleinen Änderungen der Konformation verbunden ist. Einzelne

Signale funktioneller Gruppen des Proteins bzw. des Ligands konnten identifiziert werden. Identische Spektren der Komplexbildung mit Leupeptin und Propionyl-Leupeptin belegen, daß beide Substanzen identische Wechselwirkungen mit dem Protein bilden. Benzamidin bindet nicht identisch, aber sehr ähnlich. Alle Liganden binden an dieselbe Bindungsstelle. Die Schlußfolgerungen aus Röntgenstrukturuntersuchungen der verschiedenen Komplexe konnten somit in Lösung bestätigt werden.

Da die zu untersuchenden Liganden in wäßrigen Puffersystemen häufig schlecht löslich sind, wird DMSO als alternatives Lösungsmittel eingesetzt. Durch Wechselwirkungen zwischen DMSO und der Proteinoberfläche kann jedoch die Struktur des Proteins verändert werden. Aus diesem Grund wurde der Einfluß unterschiedlicher DMSO Konzentrationen auf das Modellsystem Trypsin-Benzamidin untersucht. Bis zu einer Konzentration von 20% DMSO konnte zwar eine Hemmung der Autolyse, aber keine Veränderung der Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand festgestellt werden. Eine Verwendung von DMSO ist in diesem Fall möglich.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurden zwei Möglichkeiten zur Automatisierung des entwickelten Verfahrens im Hinblick auf einen Einsatz im High-Throughput-Screening der Arzneimittelforschung erprobt.

Bei der Mischmethode werden 50:50 Mischungen zwischen Protein und Ligand einerseits und Protein und Puffer andererseits hergestellt und verglichen. Unbedingte Voraussetzung ist dabei eine gute Reproduzierbarkeit des Mischungsverhältnisses. Die Auswirkungen des Einsatzes unterschiedlicher Pumpensysteme und Mischer auf die Reproduzierbarkeit des Mischungsverhältnisses wurde getestet. Eine ausreichende Reproduzierbarkeit wurde erreicht. Eine weitere Verbesserung erfordert zwar einen hohen apparativen Aufwand, erscheint aber möglich.

Als zweites Verfahren wurde eine Drei-Kammer-Zelle entwickelt. Diese Zelle besitzt zwei planparallele Kammern, die gleichzeitig von dem Infrarotstrahl durchstrahlt werden. Auf diese Weise läßt sich ein Summenspektrum Protein plus Ligand messen. Das Spektrum der Mischung bzw. des Komplexes wird in einer dritten Kammer gemessen. Voraussetzung ist dabei eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Schichtdicken und eine 50:50 Mischung beider Substanzen in der gemeinsamen Kammer. Der Prototyp einer solchen Zelle wurde aus Silizium mit Hilfe mikrosystemtechnischer Verfahren hergestellt und getestet. Mit Hilfe dieses Prototyps konnte gezeigt werden, daß eine solche Zelle prinzipiell möglich ist. Zuvor müssen aber neuartige Methoden zur Mikrostrukturierung von Substraten mit niedrigerer Brechzahl entwickelt werden.

10 Literaturverzeichnis

Areas E. P. G., Areas J. A. G., Hamburger J., Peticolas W. L. und Santos P. S. (1996), *On the High Viscosity of Aqueous Solution of Lysozyme Induced by Some Organic Solvents*, Journal of Colloid & Interface Science, 180, 578-589.

Arrondo J. L. R., Muga A., Castresana J. und Goñi F. M. (1993), *Quantitative Studies of the Structure of Proteins in Solution by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*, Prog. Biophys. Molec. Biol., 59, 23-56.

Babine R. E. und Bender S. L. (1997), *Molecular Recognition of Protein-Ligand Complexes: Applications to Drug Design*, Chem. Rev., 97, 1359-1472.

Barth A. und Mäntele W. (1999), Manuskript in Vorbereitung.

Barth A., Mäntele W. und Kreutz W. (1991), *Infrared Spectroscopic Signals Arising from Ligand Binding and Conformational Changes in the Catalytic Cycle of Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase*, Biochim. Biophys. Acta, 1057, 115-123.

Bauscher M., Leonhard M., Moss D. A. und Mäntele W. (1993), *Binding and Interaction of the Primary and the Secondary Electron Acceptor Quinones in Bacterial Photosynthesis. An Infrared Spectroelectrochemical Study of Rhodobacter sphaeroides Reaction Centers*, Biochim. Biophys. Acta, 1193, 59-71.

Baymann F. (1995), *Der Cytochrom bc_1 -Komplex des Purpurbakteriums Rhodobacter capsulatus*, Dissertation, Universität Freiburg.

Bhattacharjya S. und Balaram P. (1997), *Effects of Organic Solvents on Protein Structures - Observation of a Structured Helical Core in Hen Egg-White Lysozyme in Aqueous Dimethylsulfoxide*, Proteins, 29, 492-507.

Bode W., Mayr I., Baumann U., Huber R., Stone S. R. und Hofsteenge J. (1989), *The Refined 1.9 Å Crystal Structure of Human Alpha-Thrombin: Interaction with D-Phe-Pro-Arg Chloromethylketone and Significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp Insertion Segment*, EMBO J., 8, 3467-3475.

Bode W. und Schwager P. (1975a), *The Refined Crystal Structure of Bovine β -Trypsin at 1.8 Å Resolution II. Crystallographic Refinement, Calcium Binding Site, Benzamidine Binding Site and Active Site at pH 7.0*, J. Mol. Biol., 98, 693-717.

- Bode W. und Schwager P. (1975b), *The Single Calcium-Binding Site of Crystalline Bovine β -Trypsin*, FEBS Lett., 56, 139-143.
- Braiman M. S., Ahl P. L. und Rothschild K. J. (1987), *Millisecond Fourier-Transform Infrared Spectra of Bacteriorhodopsin's M_{412} Photoproduct*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 5221-5225.
- Broach J. R. und Thorner J. (1996), *High-Throughput Screening for Drug Discovery*, Nature, 384, 14-16.
- Brookhaven Protein Data Base, [WWW Seite], vom 25 Oct 1999, URL: <http://www.rcsb.org/pdb/holdings.html>.
- Buono R. A., Prestrelski S. J., Liebman M. N. und Byler D. M. (1994), *Infrared Spectroscopic Studies of Calcium Binding to Inhibited β -Trypsins*, Biochim. Biophys. Acta, 1204, 124-128.
- CRC (1994), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Boca Raton.
- Doyle W. M. (1991), *Internal Reflectance Apparatus and Method Using Cylindrical Elements*, US 4 988 195.
- Dunn B. C. und Eyring E. M. (1999), *Stopped-Flow Rapid-Scan Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, Appl. Spectrosc., 53, 292-296.
- Ehrfeld W., Golbig K., Hessel V., Lowe H. und Richter T. (1999), *Characterization of Mixing in Micromixers by a Test Reaction: Single Mixing Units and Mixer Arrays*, Ind. Chem. Res., 38, 1075-1082.
- Eppendorf, [WWW Seite], vom 21 Sep 1999, URL: <http://www.eppendorf.de/katalog/katalog1999>.
- Fersht A. (1985), *Structures and Mechanisms of Selected Enzymes; The Proteases*, Seiten 405-426, *Enzyme Structure and Mechanism*, 2. Auflage, Autor: Fersht A., W. H. Freeman and Company, New York.

- Fitzer E. und Fritz W. (1989), *Technische Chemie: Einführung in die Chemische Reaktionstechnik*, 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Gerlach M. (1997), *Weiterentwicklung des plasmalosen Br₂/F₂-Ätzprozesses für Silizium, Herstellung eines Abformwerkzeuges für Mikrolinsen und deren optische Vermessung*, Diplomarbeit, Forschungszentrum Karlsruhe.
- Gibson Q. H. und Antonini E. (1960), *Kinetic Studies on the Reaction between Native Globin and Haem Derivatives*, *Biochem J.*, 77, 328-341.
- Gibson Q. H. und Milnes L. (1964), *Apparatus for Rapid and Sensitive Spectrophotometry*, *Biochem. J.*, 91, 161-171.
- GlaxoWellcome (1996), *Redesigning Drug Discovery*, *Nature*, 384, 1-5.
- Gottwald W. und Wachter G. (1997), *IR-Spektroskopie für Anwender*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Green N. M. (1963), *Avidin: The Use of [¹⁴C]Biotin for Kinetic Studies and for Assay*, *Biochem. J.*, 89, 585-591.
- Guber A. (1986), *Reaktion von Uranhexafluoriden mit Fluorelastomeren*, KfK-Bericht Nr. 4029.
- Ibbotson D. E., Mucha J. A. und Flamm D. L. (1984), *Plasmaless Dry Etching of Silicon with Fluorine-Containing Compounds*, *J. Appl. Phys.*, 56, 2939-2942.
- Jackson M. und Mantsch H. H. (1991), *Beware of Proteins in DMSO*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1078, 231-235.
- Jacob S. W., Rosenbaum E. E. und Wood D. C. (1971), *Dimethyl Sulfoxide*, Marcel Dekker, New York.
- Johnston S. F. (1991), *Fourier Transform Infrared: A Constantly Evolving Technology*, Ellis Horwood Limited, Chichester (West Sussex).
- Keens A. und Simon A. (1990), *Correction of Non-Linearities in Detectors in Fourier Transform Spectroscopy*, US 4,927,269.
- Kessler H. (1997), *Ein neuartiges Verfahren zur Wirkstoffsuche mit einem kombinatorisch-rationalen Ansatz*, *Angew. Chem.*, 109, 857-859.

- Klibanov A. M. (1989), *Enzymatic Catalysis in Anhydrous Organic Solvents*, Trends Biochem. Sci., 14, 141-144.
- Knöziger E. (1976), *Ferninfrarot-Fourier-Spektroskopie als Methode der Strukturaufklärung in der Chemie*, Angew. Chem., 88, 1-32.
- Köhler U., Guber A. E., Bier W. und Hecke M. (1996), *Fabrication of Microlenses by Plasmaless Isotropic Etching Combined with Plastic Moulding*, Sensors & Actuators A-Physical, 53, 361-363.
- Köhler U., Guber A. und Bier W. (1995), *Plasmales und laserinduziertes Ätzen von Silizium mit den Halogenen Fluor, Chlor und Brom*, Wissenschaftliche Berichte 5574, Forschungszentrum Karlsruhe.
- Krantz A. (1992), *A Classification of Enzyme Inhibitors*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2, 1327-1334.
- Kuchling H. (1991), *Taschenbuch der Physik*, 13. Auflage, Fachbuchverlag, Leipzig.
- Kurinov I. V. und Harrison R. W. (1996), *Two Crystal Structures of the Leupeptin-Trypsin Complex*, Protein Sci., 5, 752-75.
- Lehninger A. L., Nelson D. L. und Cox M. M. (1994), *Prinzipien der Biochemie*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Mäntele W. (1993), *Reaction-Induced Infrared Difference Spectroscopy for the Study of Protein Function and Reaction Mechanisms*, Trends Biochem. Sci., 18, 197-202.
- Mäntele W. (1996), *Infrared and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*, Seiten 137-160, *Biophysical Techniques in Photosynthesis*, Herausgeber: Amesz J. und Hoff A. J., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Mäntele W., Nabedryk E., Taviatian B. A., Kreutz W. und Breton J. (1985), *Light-Induced Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopic Investigation of the Primary Electron Donor in Bacterial Photosynthesis*, FEBS Lett., 187, 227-232.
- Mantz A. W. (1976), *Infrared Multiplexed Studies of Transient Species*, Appl. Spectrosc., 30, 459-461.
- March J. (1992), *Advanced Organic Chemistry: Reaction, Mechanism and Structure*, John Wiley & Sons, New York.

- Marquart M., Walter J., Deisenhofer J., Bode W. und Huber R. (1983), *The Geometry of the Reactive Site of the Peptide Group in Trypsin, Trypsinogen and its Complexes with Inhibitors*, Acta Cryst., B39, 480-490.
- Martin D. und Hauthal H. G. (1975), *Dimethyl Sulfoxide*, Van Nostrand Reinhold, Wokingham.
- Masuch R. (1999), Dissertation, Forschungszentrum Karlsruhe.
- Masuch R. (1997), Diplomarbeit, Universität Karlsruhe.
- Menz W. und Mohr J. (1997), *Mikrosystemtechnik für Ingenieure*, 2., erweiterte Auflage, Auflage, VCH, Weinheim.
- Moreau T. und Choplin H., *Prolysis a Protease and Protease Inhibitor Web Server* [WWW Seite], vom 20 Jan 1990, URL: <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/index.html>.
- Moss D. A., Nabedryk E., Breton J. und Mäntele W. (1990), *Redox-linked Conformational Changes in Proteins Detected by a Combination of Infrared Spectroscopy and Protein Electrochemistry*, Eur. J. Biochem., 187, 565-572.
- Neurath H. und Schwert G. W. (1950), *The Mode of Action of the Crystalline Pancreatic Proteolytic Enzymes*, Chem. Rev., 46, 69-153.
- Ortiz C., Tellier C., Williams H., Stolowich N. J. und Scott A. I. (1991), *Diastereotopic Covalent Binding of the Natural Inhibitor Leupeptin to Trypsin: Detection of Two Interconverting Hemiacetals by Solution and Solid-State NMR Spectroscopy*, Biochem., 30, 10026-10034.
- Plunkett M. J. und Ellman J. A. (1997), *Combinatorial Chemistry and New Drugs*, Scientific American, 276, 68-73.
- Prestrelski S. J., Byler D. M. und Liebman M. N. (1991), *Comparison of Various Molecular Forms of Bovine Trypsin: Correlation of Infrared Spectra with X-ray Crystal Structures*, Biochemistry, 30, 133-143.
- Rothschild K. J., Cantore W. A. und Marrero H. (1983), *Fourier Transform Infrared Difference Spectra of Intermediates in Rhodopsin Bleaching*, Science, 219, 1333-1335.

- Rothschild K. J. und Marrero H. (1982), *Infrared Evidence that the Schiff Base of Bacteriorhodopsin is Protonated: bR570 and K Intermediates*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4045-4049.
- Schechter I. und Berger A. (1967), *On the Size of the Active Site in Proteases*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 27, 157-162.
- Shimbo M., Furrakawa K., Fukuda K. und Tanzawa K. (1986), *Silicon-to-Silicon Direct Bonding Method*, J. Appl. Phys., 60, 2987-2989.
- Shoat S. E. und Feinerman A. D. (1994), *Aligned Au-Si Eutectic Bonding of Silicon Structures*, J. Vac. Sci. Technol. A, 12, 19-22.
- Shuker S. B., Hajduk P. J., Meadows R. P. und Fesik S. W. (1996), *Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR*, Science, 274, 1531-1534.
- Siebert F. (1995), *Infrared Spectroscopy Applied to Biochemical and Biological Problems*, Methods in Enzymology, 246, 501-526.
- Siebert F. (1996), *Equipment: Slow and Fast Infrared Kinetic Studies*, Seiten 83-106, *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, Herausgeber: Mantsch H. H. und Chapman D., Wiley-Liss, New York.
- Siebert F., Mäntele W. und Kreutz W. (1980), *Flash-Induced Kinetic Infrared Spectroscopy Applied to Biochemical Systems*, Biophys. Struct. Mech., 6, 139-146.
- Souvignier G. und Gerwert K. (1992), *Proton Uptake Mechanism of Bacteriorhodopsin as Determined by Time-Resolved Stroboscopic FTIR-Spectroscopy*, Biophys. J., 63, 1393-1405.
- Stryer L. (1991), *Biochemie*, Springer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York.
- Sun E. und Cohen F. E. (1993), *Computer-Assisted Drug Discovery - a Review*, Gene, 137, 127-132.
- Swamy M. J., Heimburg T. und Marsh D. (1996), *Fourier-Transform Infrared Spectroscopic Studies on Avidin Secondary Structure and Complexation with Biotin and Biotin-Lipid Assemblies*, Biophysical Journal, 71, 840-847.
- SWISS-PROT, 1997, *Primary Accession Number: POO760; Entry Name: TRY1_BOVIN; Trypsinogen Cationic [Precursor] [Fragment] [WWW Seite]*, vom 7 Dec 1999, URL: [http://www.expsy.ch/cgi-bin/get-full-entry?\[SWISS_PROT-ID:'TRY1_BOVIN'\]](http://www.expsy.ch/cgi-bin/get-full-entry?[SWISS_PROT-ID:'TRY1_BOVIN']).

SWISS-PROT, [WWW Seite], vom 7 Jul 1999, URL: <http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html>.

Tiensuu A.-L., Bexell M., Schweitz J.-Å., Smith L. und Johansson S. (1994), *Assembling Three Dimensional Microstructures Using Gold-Silicon Eutectic Bonding*, Sensors and Actuators A, 45, 227-236.

Uhmann W., Becker A., Taran C. und Siebert F. (1991), *Time-Resolved FT-IR Absorption Spectroscopy Using a Step-Scan Interferometer*, Appl. Spectrosc., 45, 390-397.

Umezawa H. (1977), *Protease Inhibitors Produced by Microorganisms*, Acta Biol. Med. Germ., 36, 1899-1915.

Umezawa H. (1982), *Low-Molecular-Weight Enzyme Inhibitors of Microbial Origin*, Ann. Rev. Microbiol., 36, 75-99.

Várallyay É., Pál G., Patthy A., Szilágyi L. und Graf L. (1998), *Two Mutations in Rat Trypsin Confer Resistance against Autolysis*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 243, 56-60.

Vauck W. R. und Mueller H. A. (1990), *Grundoperationen chemischer Verfahrenstechnik*, 8. Auflage, VCH, Weinheim.

Venyaminov S. Y. und Prendergast F. G. (1997), *Water (H_2O and D_2O) Molar Absorptivity in the 1000-4000 cm^{-1} Range and Quantitative Infrared Spectroscopy of Aqueous Solutions*, Analytical Biochemistry, 248, 234-245.

Venyaminov S. Y. und Kalnin N. N. (1990), *Quantitative IR Spectroscopy of Peptide Compounds in Water (H_2O) Solutions. I. Spectral Parameters of Amino Acid Residue Absorption Bands*, Biopolymers, 30, 1243-1257.

Vestling M. M., Murphy C. M. und Fenselau C. (1990), *Recognition of Trypsin Autolysis Products by High-performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry*, Anal. Chem, 62, 2391-2394.

White A. J., Drabble K. und Wharton C. W. (1995), *A Stopped-Flow apparatus for Infrared Spectroscopy of Aqueous Solutions*, Biochem. J., 306, 843-849.

White-Stevens R. H. und Kamin H. (1972), *Studies of a Flavoprotein, Salicylate Hydroxylase I. Preparation, Properties and the Uncoupling of Oxygen Reduction from Hydroxylation*, J. Biol. Chem., 247, 2358-2370.

Wiemer M. und Herziger K. (1995), *Silizium-Waferbonden: Montageprozesse für Silizium- und Glasmaterialien in der Mikromechanik*, Bericht, Technische Universität Chemnitz-Zwickau.

Wolffenbittel R. F. und Wise K. D. (1994), *Low-Temperature Silicon Wafer-to-Wafer Bonding Using Gold at Eutectic Temperature*, Sensors and Actuators A, 43, 223-229.

Zaks A. und Klibanov A. M. (1988), *Enzymatic Catalysis in Nonaqueous Solvents*, J. Biol. Chem., 263, 3194-3201.

11 Anhang

11.1 Verwendete Chemikalien

Kaliumhexacyanoferrat(II) p.a.	Merck 4984
Kaliumhexacyanoferrat(III) p.a.	Merck 4973
Pufferlösung gebrauchsfertig (Phosphat) pH=6.88	Merck 1.07294
Acetat-Puffer gebrauchsfertig pH=4.66	Merck 1.07827
Trypsin	Sigma T-4665
Benzamidin	Sigma B-6506
Trizma Hydrochlorid	Sigma T-3253
Calciumchlorid-Dihydrat p.a.	Merck 2382
Benzoessäure Na-Salz	Aldrich 10.916-6
Leupeptin	Sigma L-0649
Propionyl-Leupeptin	Sigma L-3402
Hydrozimsäure (3-Phenylpropionsäure)	Sigma H-7508
Dimethylsulfoxid (DMSO) über Molekularsieb	Fluka 41648
Schwefelsäure 95-97%	Merck 1.00731
Perhydrol Wasserstoffperoxid 30%	Merck 1.07210
Kaliumhydroxid Plätzchen	Fluka 60375

11.2 Geräte

UV/VIS-Spektroskopie

Polytec X-dap Diodenarray-Spektralphotometer
AMKO LTI Universal-Lampennetzgerät LPS 210
AMKO LTI Lampengehäuse A1000
OSRAM XBO 75W/2 OFR

FTIR-Spektroskopie

BRUKER Equinox55
Rapid Scan Option
Probenraum mit getrockneter Luft gespült

Flußsysteme

Alltech HLPC-Pumpe 420
Harvard Apparatus Spritzenpumpe 44
Harvard Apparatus Edelstahlspritze 8 ml

Aufsatz für 2 Spritzen (FZK)
VALCO HPLC-Ventile C2-2006EH
PEEK-Kapillaren OD 1/16", ID=0.006" und =0.02" (Alltech bzw. VALCO)
Verschraubungen etc. VALCO 1/16"
Alltech PEEK Mischstück
Mikromischer Institut für Mikrotechnik Mainz

11.3 FTIR-Meßparameter und Bearbeitung der Spektren

Software:

Steuersoftware für BRUKER FTIR (in unserer Arbeitsgruppe von Dr. D. Moss programmiert)
Lab Instrument (in unserer Arbeitsgruppe von Dr. D. Moss programmiert)
MS EXCEL
SigmaPlot

Für die Strömungsprofile:

auto gain
switch gain off
MCT-Detektor (gekühlt mit flüssigem Stickstoff)
Nichtlinearitätskorrektur mit Cutoff bei 680 cm^{-1} und Modulationseffizienz 0.34
Spiegelgeschwindigkeit: 10-12
Optischer Filter mit Cutoff bei 3000 cm^{-1} und 1200 cm^{-1}
Wellenzahlbereich: $2250\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$
vorwärts/schneller Rücklauf bzw. vorwärts/rückwärts mit Teilung
doppelseitiges Interferogramm
Rapid Scan Modus
1-4 Scans pro Zeitpunkt

Für die Differenzspektren:

auto gain
switch gain off
MCT-Detektor (gekühlt mit flüssigem Stickstoff)
Nichtlinearitätskorrektur mit Cutoff bei 680 cm^{-1} und Modulationseffizienz 0.34
Spiegelgeschwindigkeit: 10
Optischer Filter mit Cutoff bei 2000 cm^{-1} und 1200 cm^{-1}
Wellenzahlbereich: $1900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$
vorwärts/schneller Rücklauf
doppelseitiges Interferogramm
64 Scans

Bearbeitung der Spektren bei Differenzspektren:

Offset-Korrektur auf den Mittelwert des Bereichs (1900-1800 cm^{-1})

keine sonstige Basislinienkorrektur

keine Wasserdampfkorrektur

keine Lösungsmittelkorrektur