

Schwefel-Bestimmung
in Proteinen und Enzymen mit der
Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TXRF)
- Möglichkeiten und Grenzen -

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich chemische und pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

von
Martina Mertens
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2001
(D F 1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften (Fb 14)
der Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. J. Engels

1. Gutachter: Prof. Dr. B. O. Kolbesen

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig

Datum der Disputation: 07.12.2001

Danksagung

Herrn Prof. Dr. B. O. Kolbesen danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der Durchführung der Arbeit und im besonderen für die Gewährung eines großen persönlichen Freiraumes bei der Bearbeitung des Themas.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Kollegen Frau C. Rittmeyer, Herrn Dr. P. Rostam-Khani, Herrn Dr. A. Wittershagen und Herrn G. Kilian für Ihre praktischen Anregungen, Ihre stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, die kritische Durchsicht der Arbeit und für die vielen zusammen verbrachten Stunden. Gernod Kilian möchte ich noch zusätzlich für die gemeinsamen und schönen Jahre des Studium danken.

Außerdem danke ich:

Herrn A. Huber und Herrn S. Metz für die TXRF-Messungen bei der Firma GeMeTec

Frau D. Ceglarek ich für die Anfertigung der REM-Aufnahmen

Frau E. Schaffert und Frau H. Simunek für die Unterstützung zahlreicher verwaltungstechnischer Angelegenheiten

Meinen Kollegen S. Hohmann, S. Steinmeyer, H. Stelter, A. Berendes, und allen anderen nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe für das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima und die wertvollen Diskussionen

Für die Isolierung der Enzyme, die wertvollen Diskussionen und die angenehme Zusammenarbeit möchte ich mich bei folgenden Damen und Herren bedanken:

Herrn Prof. Dr. B. Ludwig und Frau Dr. U. Pfitzner

Herrn Prof. Dr. H. Rüterjans und Frau Dr. E. I. Scharff

Herrn Prof. Dr. U. Brandt, Herrn Prof. Dr. H. Schägger, Herrn Dr. J. G. Okun und Herrn Dr. V. Zickermann

Herrn Prof. Dr. A. Kröger, Herrn Dr. R. Groß und Herrn Dr. O. Klimmek

INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole	iv
I. Einleitung	1
1.1 Spurenelementanalytik in biologischen Matrices	1
1.2 Ziele der Arbeit	2
II. Analytische Methoden.....	4
2.1 Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse	4
2.1.1 Theoretische Grundlagen	4
2.1.2 Stehende Wellen und Fluoreszenzintensität verschiedener Systeme.....	6
2.1.3 Quantifizierung über interne Standardisierung und Nachweisgrenzen	7
2.1.4 Voraussetzungen und Grenzen	9
2.1.5 TXRF von leichten Elementen – Einführung in die Problematik	11
2.1.6 Gerätespezifikation.....	13
2.2 ALPHA-Step	14
2.3 Rasterelektronenmikroskopie	14
III. Präparativer Teil Enzymanalytik	16
3.1 Untersuchte Enzyme	16
3.1.1 Diisopropylfluorophosphatase (DFPase).....	16
3.1.2 NADH:Q Oxidoreduktase (Komplex I)	17
3.1.3 Cytochrom <i>c</i> Oxidase.....	18
3.2 Allgemeiner Präparationsablauf.....	19
IV. Überprüfung der relativen Empfindlichkeitsfaktoren.....	21
4.1 Bestimmung der relativen Empfindlichkeitsfaktoren.....	22
4.2 Matrix/-Konzentrationsabhängigkeit des relativen Empfindlichkeitsfaktors für das Element Schwefel.....	24
4.3 Diskussion	27

V. Trocknungsmethoden	30
5.1 Probenpräparation	30
5.2 Cytochrom <i>c</i> Oxidase.....	31
5.2.1 TXRF-Ergebnisse.....	31
5.2.2 Topologische Untersuchungen	32
5.3 NADH:Q Oxidoreduktase (Komplex I)	33
5.3.1 TXRF-Ergebnisse.....	33
5.3.2 Topologische Untersuchungen	35
VI. Evaluation der TXRF-Analysen von Enzymproben	37
6.1 Schwefel-Bestimmung	37
6.1.1 Probenpräparation	37
6.1.2 Diisopropylfluorophosphatase (DFPase).....	39
6.1.3 Cytochrom <i>c</i> Oxidase.....	41
6.1.4 NADH:Q Oxidoreduktase (Komplex I)	43
6.2 Cofaktoren Bestimmung	46
VII. Beeinflussung der Rückstandsbildung	50
7.1 Wirkungsweisen der Filmbildner	51
7.2 Probenpräparation	51
7.3 TXRF-Ergebnisse.....	53
7.1.1 Diisopropylfluorophosphatase (DFPase).....	53
7.1.2 Cytochrom <i>c</i> Oxidase.....	55
7.1.3 NADH:Q Oxidoreduktase (Komplex I)	57
7.4 Topologische Untersuchungen	59
VIII. Anregung unter Verwendung einer Cr-Kα-Strahlung zur besseren Detektion leichterer Elemente	62
9.1 Schwefel-Wiederfindung in wässriger Matrix	63
8.1.1 TXRF-Ergebnisse.....	63
8.1.2 Topologische Untersuchungen	65
8.2 Schwefel-Wiederfindung in einer Enzymmatrix.....	66
8.2.1 TXRF-Ergebnisse.....	67
8.2.2 Topologische Untersuchungen	69
8.2.3 Winkelabhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten und horizontale Positionierung (γ -Scan).....	69

IX. Diskussion der experimentellen Befunde	74
9.1 Relative Empfindlichkeitsfaktoren	74
9.2 Evaluation der Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse für die Analyse von Enzymproben	75
9.2.1 Trocknungsmethoden	75
9.2.2 Evaluation der Schwefel-Bestimmung	76
9.2.3 Vergleich der Proteinbestimmungen mittels TXRF und biochemischen Verfahren.....	81
9.2.4 Evaluation der Cofaktoren-Bestimmung	84
9.2.5 Kritische Schichtdicken	85
9.2.6 Erfassungsgrenzen	85
X. Anwendungen	88
10.1 Diisopropylfluorophosphatase (DFPase).....	88
10.1.1 Metallaustausch über Gleichgewichtsdialyse.....	88
10.1.2 Metallaustausch durch Rückfaltung der DFPase.....	90
10.1.3 Bestimmung des Selengehaltes der mit Selenomethionin gelabelten DFPase.....	90
10.1.4 Untersuchung von Mutanten	91
10.2 Cytochrom <i>c</i> Oxidase.....	92
XI. Zusammenfassung und Ausblick	94
Anhang	96
Anhang A Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	96
Anhang B Statistische Prüfmethode n	103
Anhang C Technische Daten und Apparatives.....	105
Literaturverzeichnis	107

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole

AAS	A tomabsorptionsspektroskopie
Abb.	Abbildung
Add.	Addition
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
DFPase	D iisopropyl f luor p hosphatase
d_{\max}	kritische Schichtdicke
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR	E lektronenspinresonanz Spektroskopie
eV	E lektronen V olt
FMN	Flavinmononucleotid (oxidierte Form)
HF	Flusssäure
I	Intensität
kDa	Kilodalton
Komplex I	NADH:Q Oxidoreduktase
MP	M illipor
NAD ⁺	Nicotinsäureamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinsäureamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
pg	Pikogramm
PMMA	Polymethymethacrylat
ppb	p arts p er b illion [$\mu\text{g}/\text{kg}$] oder [$\mu\text{g}/\text{l}$]
ppm	p arts p er m illion [mg/kg] oder [mg/l]
ppt	p arts p er t rillion [ng/kg] oder [ng/l]
PVA	P oly v inyl a lkohol
Q	Ubichinon
QH ₂	Ubichinol
REM	R asterelektronen m ikroskopie
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	relative Empfindlichkeit
sog.	sogenannte
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TXRF	T otal R eflection X - R ay F luorescence Analysis
vgl.	vergleiche
vs.	versus

KAPITEL I

Einleitung

1.1 Spurenelementanalytik in biologischen Matrices

Lange Zeit wurden die sog. „Spurenelemente“ als nur zufällig vorhandene Bestandteile des Organismus angesehen. Seitdem erkannt wurde, dass essentielle Spurenelemente wie Chrom, Mangan, Eisen, Kobalt, Nickel, Kupfer, Zink, Selen oder Iod wichtige biologische Funktionen ausüben, hat die Spurenelementanalytik in den verschiedensten biologischen Materialien in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Einhergehend mit der Verbesserung der Nachweisgrenzen für die zu analysierenden Elemente hat sich in der Zwischenzeit ein weites Feld an Forschungsgebieten entwickelt, da die genauen Wirkungsweisen und Wechselwirkungen der Spurenelemente oft noch weitgehend ungeklärt sind.

Bei der quantitativen Spurenelementbestimmung in biologischen Proben wird die Auswahl der Analysemethoden u. a. durch die erforderlichen Nachweisgrenzen, die zum Teil sehr komplexe Matrix und das zur Verfügung stehende Probenvolumen bestimmt. Überwiegend finden hier die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) [1, 2], die Massenspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) [3, 4], die (instrumentelle) Neutronen-Aktivierungs-Analyse ((I)NAA) [5, 6] oder die Protoneninduzierte Röntgen-Emissionsanalyse (PIXE) [7, 8] ihren Einsatz. Jede der genannten Methoden hat ihre Vor- und Nachteile. Als Nachteile sind v. a. zu nennen: hohe Matrixempfindlichkeit, hoher Probenverbrauch, keine Multielementanalyse (im Fall der AAS), Zerstörung der Proben und hohe Kosten.

Das Potential der Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TXRF) mit ihrer hohen Empfindlichkeit für die Spurenbestimmung von Übergangsmetallen auf dem Gebiet der Elementspurenanalytik in verschiedenen biologischen Matrices [9-17] - und speziell auf dem Gebiet der Enzymanalytik [18-20] - wurde schon mehrfach in der Literatur beschrieben. Enzyme sind hoch-spezialisierte, dynamische Substanzen, die als Katalysatoren wirken und im Stoffwechsel fast alle chemischen Reaktionen steuern. Die Katalysatoraktivität eines Enzyms wird von der Aminosäuresequenz und die in ihr festgelegten höheren Strukturordnungen bestimmt. Viele Enzyme benötigen für ihre Tätigkeit sog. Cofaktoren. Ihnen kommt bei den ablaufenden enzymatisch-katalytischen Stoffwechselprozessen im Organismus eine Schlüsselrolle zu. Aufgrund ihrer biologischen Verfügbarkeit und ihrer spezifischen Eigenschaften bilden hauptsächlich Übergangsmetalle wie Eisen, Nickel,

Kupfer, Mangan oder Molybdän einen Teil des aktiven Zentrums in Proteinen oder Enzymen [21]. Um die Struktur und die Funktion dieser biologischen Makromoleküle verstehen zu können ist es notwendig, diese Metall-Ionen (Cofaktoren) eindeutig zu identifizieren, zu quantifizieren und zu lokalisieren.

in der Enzymanalytik kommt auch der Analyse von leichten Elementen eine bedeutende Rolle zu. Hierbei ist gerade das Element Schwefel als Nebenbestandteil von besonderem Interesse. Neben seiner Bestimmung in biologischen Proben ist es u. a. auch in der Materialanalyse von Wichtigkeit. In Enzymen und Proteinen ist der Schwefel Bestandteil der beiden Aminosäuren Cystein und Methionin, sowie bei einigen Enzymen auch als sulfidischer Bestandteil in den sogenannten Eisen-Schwefel-Clustern. Die quantitative Analyse des Schwefelgehaltes aus den beiden schwefelhaltigen Aminosäuren erlaubt eine simultane und einfache Bestimmung der Enzym- oder Proteinkonzentration in einer Probe. Anhand der Enzymkonzentration und der bestimmten weiteren Elementgehalte in einer Enzymprobe können die entsprechenden molaren Elementstöchiometrien pro Enzymkomplex berechnet werden.

Biochemische Enzym- oder Proteinbestimmungsmethoden, wie z. B. die Lowry-Methode [22-24], können in Abhängigkeit des Enzyms oder Proteins größere Fehler aufweisen. Für die Analyse von Cofaktoren kann diese Fehlerbreite, in Abhängigkeit von der Größe des zu untersuchenden Enzyms, Unterschiede bis in die Größenordnung der berechneten Element-Stöchiometrien verursachen.

1.2 Ziele der Arbeit

Die Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TXRF) hat in den letzten Jahren einen festen Platz unter den leistungsstarken Multielementmethoden eingenommen. Aufgrund der einfachen Quantifizierbarkeit, der niedrigen Nachweisgrenzen und dem nur gering benötigten Probenvolumen ist sie eine überaus gut geeignete Methode zur simultanen Elementanalytik in biologischen Proben.

In der vorliegenden Arbeit wird zunächst eine Überprüfung der relativen Empfindlichkeitsfaktoren (Kalibrierfaktoren) des verwendeten TXRF-Spektrometers durchgeführt. Für die quantitative Auswertung sind diese Kalibrierfaktoren eine wichtige Voraussetzung. Für das Element Schwefel werden zusätzlich die Auswirkungen der Matrixeffekte auf den Kalibrierfaktor untersucht.

Anschließend wird eine geeignete Trocknungsmethode in Hinblick auf die Element-Wiederfindungen und Trockenrückstände für die Analyse der Enzymproben mit der TXRF evaluiert. Da Trocknungen bei höheren Temperaturen zu einer Denaturierung der Enzymstruktur führen, besteht die Gefahr von Schichtdicken- und Entmischungseffekten bis hin zu möglichen Elementverlusten.

Einer der beiden Kernpunkte dieser Arbeit liegt in der Evaluierung der Protein- bzw. Enzymkonzentration über die Bestimmung des Schwefel-Gehaltes mittels TXRF. Hierbei werden die Möglichkeiten und Grenzen der Methode anhand ausgewählter Enzymbeispiele aufgezeigt. Ein wichtiger beeinflussender Parameter bei der Bestimmung von leichten Elementen sind Absorptionseffekte der Fluoreszenzstrahlung aufgrund von Schichtdickeneinflüssen der Trockenrückstände. Die Charakterisierung der Trockenrückstände wird durch den Einsatz eines Schichtdickenmessgerätes (*ALPHA-Step*) und einem Rasterelektronenmikroskop zur Darstellung der Topologie unterstützt. Um solche Schichtdickeneffekte weiter minimieren zu können, wird der Einfluss von Filmbildnern bei der Präparation von Enzymproben untersucht.

Ein Nachteil herkömmlicher TXRF-Spektrometer ist ihr Empfindlichkeitsmangel für leichte Elemente. Die Untergrenze in der Detektierbarkeit wird dabei normalerweise durch die Elemente Schwefel und Phosphor repräsentiert. Für die Schwefelbestimmung war es im Rahmen der Arbeit möglich, die bei dem verwendeten TXRF-Spektrometer zur Verfügung stehenden Anregungsmodi mit denen eines für die Analyse von leichten Elementen optimierten, neu entwickelten TXRF-Spektrometer zu vergleichen.

Der weitere Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit liegt auf der Weiterentwicklung der Anwendungsgebiete bei der Bestimmung von Spurenelementkonzentrationen in Enzymen bzw. Proteinen. Im letzten Teil der Arbeit werden einige ausgewählte Beispiele der bearbeiteten Projekte näher vorgestellt. Dabei wird die Flexibilität der TXRF für vielfältige Fragestellungen in der Biochemie aufgezeigt.

KAPITEL II

Analytische Methoden

2.1 Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse

Die Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse (Total Reflection X-Ray Fluorescence Analysis, TXRF) ist ein Verfahren der Röntgenspektralanalyse. Sie findet ihren Einsatz in vielen Bereichen der Mikro- und Spurenanalytik [13, 18, 25-35] sowie in der Oberflächenanalytik der Halbleiterindustrie [36-38]. Bei dieser zerstörungsfreien Analysenmethode können simultan weitgehend alle Elemente des Periodensystems quantitativ bis in den unteren pg-Bereich bzw. bis zu 10^{10} Atomen/cm² mit hoher Präzision bestimmt werden.

Die einfallende Röntgenstrahlung wird auf einem polierten und optisch ebenen Probenträger totalreflektiert. Die auf dem Probenträger in dünner Schicht aufgebrachte Analysenprobe wird durch den einfallenden und totalreflektierten Röntgenstrahl zur Aussendung charakteristischer Röntgenfluoreszenzstrahlung angeregt. Diese wird durch einen senkrecht zur Probe angeordneten energiedispersiven Halbleiterdetektor erfasst (Abb. 2.1).

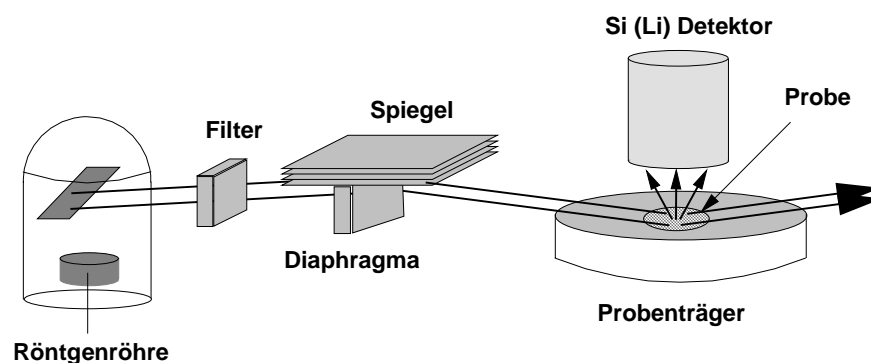


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau eines TXRF-Spektrometers (Extra II A).

2.1.1 Theoretische Grundlagen

Die theoretischen Grundlagen der Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse sind in der Literatur vielfach beschrieben [39] und sollen aus diesem Grund hier nur in den Grundzügen vorgestellt werden.

Röntgenstrahlung wird beim Übergang zwischen homogenen Medien unterschiedlich optischer Dichte reflektiert oder gebrochen. Die optische Dichte wird durch den komplexen Brechungsindex n beschrieben:

$$n = 1 - \delta - i\beta \quad \text{Gl. 2.1}$$

n : komplexer Brechungsindex

δ : dispersiver Term

β : absorptiver Term bzw. Schwächungsterm

Der Realteil δ wird als dispersiver Term bezeichnet und gibt einen Ausdruck für die Phasengeschwindigkeit, mit der sich eine Welle in einem Medium ausbreitet, an. δ ist in erster Linie abhängig von der Dichte des reflektierenden Materials und weist für Röntgenstrahlen Größenordnungen von 10^{-6} auf [40]. Der die Schwächung der Röntgenstrahlen beim Durchgang durch Materie beschreibende Imaginärteil β wird hauptsächlich durch den Massenabsorptionskoeffizienten (μ/ρ) bestimmt. Für Röntgenstrahlen liegt β in der Größenordnung von 10^{-11} . Beide Größen sind von der Wellenlänge bzw. Energie der Primärstrahlung abhängig. In Gleichung 2.1 kann β vernachlässigt werden ($\beta \ll \delta$), so dass sich für den Brechungsindex n ein Wert ergibt, der geringfügig kleiner als 1 ist. Somit ist für Röntgenstrahlung jedes Medium optisch dünner als das Vakuum oder Luft und der Röntgenstrahl wird vom Einfallslot weggebrochen. Totalreflexion tritt dann ein, wenn die Röntgenstrahlen das Medium unter streifendem Einfall treffen. Dabei muss dieser Einfallswinkel einen kritischen Wert (Grenzwinkel φ_c) unterschreiten, der sich aus dem Snellius'schen Gesetz ableiten lässt:

$$\varphi_c = \sqrt{2\delta} \quad \text{Gl. 2.2}$$

Für Mo-K α -Strahlung (17,4 keV) beispielsweise beträgt der kritische Winkel an einer Quarzoberfläche 1,75 mrad ($\sim 0,1^\circ$).

Zwei weitere wichtige Parameter der Totalreflexion sind die Reflektivität R und die Eindringtiefe Z_p , die sich mit Hilfe der Fresnel-Gleichungen [41] ableiten lassen. Für die TXRF sind eine hohe Reflektivität unterhalb des Grenzwinkels φ_c bei einer gleichzeitigen Eindringtiefe von wenigen Nanometern charakteristisch. Die niedrige Eindringtiefe bewirkt eine Reduktion von Streuprozessen (Compton- und Rayleigh-Streuung) und Sekundärstrahlungen aus dem Reflektormaterial und resultiert in einem sehr niedrigen spektralen Untergrund [42].

2.1.2 Stehende Wellen und Fluoreszenzintensität verschiedener Systeme

Die Ausbildung von stehenden Wellen oberhalb der Grenzfläche und innerhalb oberflächennaher Schichten aufgrund von Interferenzerscheinungen der einfallenden und totalreflektierten Röntgenstrahlung ist ein weiteres wichtiges Charakteristikum der TXRF. Das ungestörte stehende Wellenfeld ist gekennzeichnet durch alternierende Abfolgen von Intensitätsminima (Nodes) und –maxima (Antinodes). Es ist abhängig vom Einfallswinkel φ und dem Abstand zur Oberfläche z . Abb. 2.2 gibt diese Verhältnisse wieder.

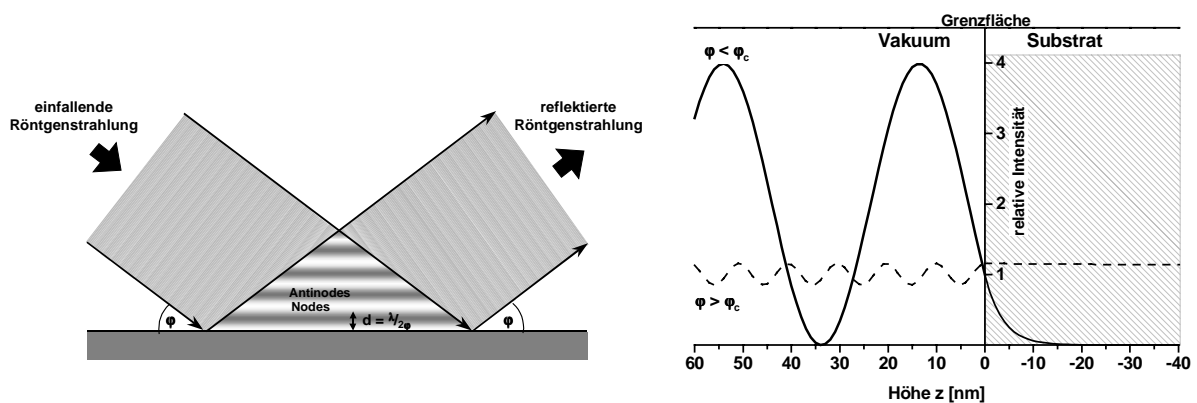


Abb. 2.2: Die Interferenzzone (stehendes Wellenfeld) zwischen einfallender und reflektierter Röntgenstrahlung (links), sowie die Intensitätsverteilung in einem stehenden Wellenfeld nach der Reflexion eines Röntgenstrahls auf einem Substrat (rechts).

Unterhalb des kritischen Winkels φ_c ist das Wellenfeld durch eine sich stark entwickelnde Abfolge der Intensitätsminima und –maxima, verknüpft mit einer sehr geringen Eindringtiefe von nur wenigen Nanometern, gekennzeichnet. Die Intensitätsmaxima zeigen 4-fache Intensität, die Intensitätsminima weisen $I_{\min} = 0$ auf. Bei Einfallswinkeln oberhalb des Grenzwinkels wird das Wellenfeld zur Oberfläche hin komprimiert, die Oszillationen zwischen Minima und Maxima sind nur noch verschwindend und die Intensitätsverteilung fast einheitlich. Die Eindringtiefe des Wellenfeldes im Substrat erreicht eine Tiefe von einigen μm .

Obiges Modell beschreibt nur die relativ einfachen Verhältnisse an der Grenzfläche zwischen Vakuum und Substrat. Für Systeme wie z.B. Partikel oder dünne Schichten auf einer Oberfläche wird das Modell wesentlich komplexer. Die Fluoreszenzstrahlung der Probe, die sich im Wellenfeld vor dem Substrat (Probenträgeroberfläche) befindet, tritt nun zusätzlich in Wechselwirkung mit dem primären Wellenfeld. Die emittierte Fluoreszenzstrahlung ist dabei proportional zur Primärintensität. In Abb. 2.3 sind die Fluoreszenzintensitäten für partikuläre Rückstände und dünne Filme dargestellt. Es bestehen deutliche

Unterschiede im winkelabhängigen Verlauf der Fluoreszenzintensitäten der beiden Systeme. Im Bereich des Grenzwinkels der Totalreflexion entwickeln sich in beiden Systemen starke, aber unterschiedliche Oszillationen der emittierten Fluoreszenzstrahlung für Partikel bzw. dünne Filme < 100 nm. Diese Oszillationen vermindern sich mit zunehmender Größe der Partikel bzw. Dicke der Schicht. Das Abfallen der Fluoreszenzintensität wird durch die Absorption bewirkt.

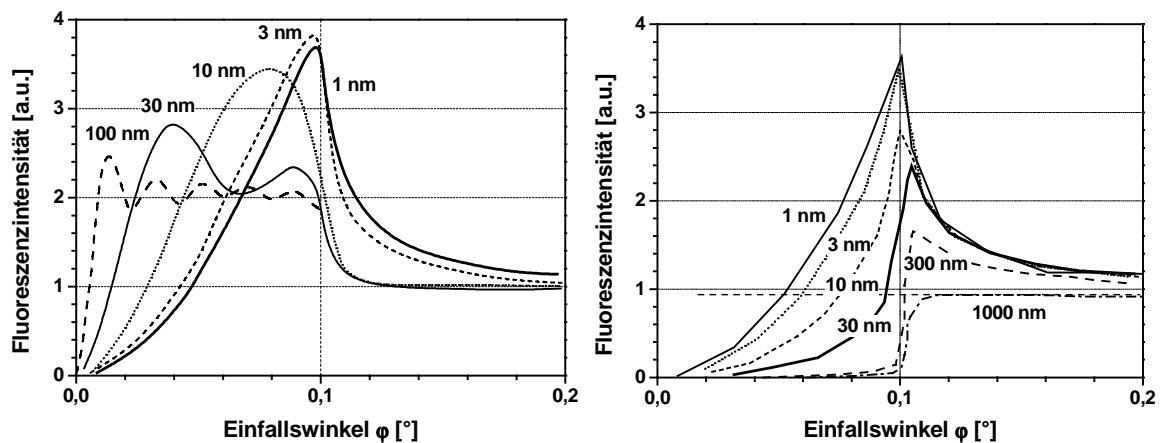


Abb. 2.3: Fluoreszenzintensität kleiner Partikel (links) und dünner Filme (rechts) auf einem Si-Substrat. Die Intensität wurde für Partikel bzw. Filme unterschiedlicher Dicke aber gleicher Masse bzw. Dichte in Abhängigkeit des Einstrahlwinkels φ für Mo-K α -Strahlung berechnet.

Die unterschiedliche Intensitätsverteilung über den Einstrahlwinkel φ für verschiedene Systeme können einerseits zur Charakterisierung der Probe herangezogen werden. Für eine quantitative Analyse ist es andererseits unabdingbar, eine Intensitätsverteilung zu erhalten, die unabhängig von der Größe der Partikel oder Dicke einer Schicht ist. Diese „ideale“ Voraussetzung ist näherungsweise für Partikel oder Schichten von einigen 100 nm bzw. für Partikel mit einer breiten Korngrößenverteilung erfüllt. Auf der anderen Seite müssen die Partikel allerdings klein genug sein, um Absorptionseffekte zu vermeiden. Dieser Effekt bedingt den Zusatz eines internen Standards. Der Standard wird der Probe zugesetzt und muss homogen über die Höhe der Partikel verteilt sein. Dann ist das Intensitätsverhältnis der Probe und des Standards konstant und somit unabhängig von der Korngröße oder der Schichtdicke, und auch vom Einstrahlwinkel φ .

2.1.3 Quantifizierung über interne Standardisierung und Nachweisgrenzen

TXRF-Analysen sind durch eine einfache und zuverlässige Quantifizierung mittels Zugabe eines internen Standards gekennzeichnet. Aufgrund der linearen Beziehung zwischen den Fluoreszenzintensitäten und den Konzentrationen der Analyten ergibt sich bei Verwen-

dung eines internen Standards bekannter Konzentration folgender linearer Zusammenhang:

$$c_x = \frac{N_x / S_x}{N_{is} / S_{is}} c_{is} \quad \text{Gl. 2.3}$$

c: Konzentration

x: Analyseelement

N: Nettointensität

is: internes Standardelement

S: relative Empfindlichkeit

Bei einer homogenen Verteilung zwischen internem Standard und Analyten ist die Quantifizierung weitgehend unabhängig von Matrixeffekten. Das Verhältnis der relativen Empfindlichkeitsfaktoren S_{is}/S_x muss vorweg in einer einmaligen Kalibrierung experimentell bestimmt werden (vgl. Kap. IV).

Nach IUPAC [43] werden die Nachweisgrenzen dann erreicht, wenn das Nettosignal N_{\min} gleich der dreifachen Standardabweichung der Hintergrundimpulszahl N_b ist:

$$N_{\min} = 3 \cdot \sqrt{N_b} \quad \text{Gl. 2.4}$$

Die instrumentellen Nachweisgrenzen der TXRF variieren entsprechend den Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Elemente. In Abb. 2.4 ist diese Beziehung zwischen Nachweisgrenze und Ordnungszahl dargestellt.

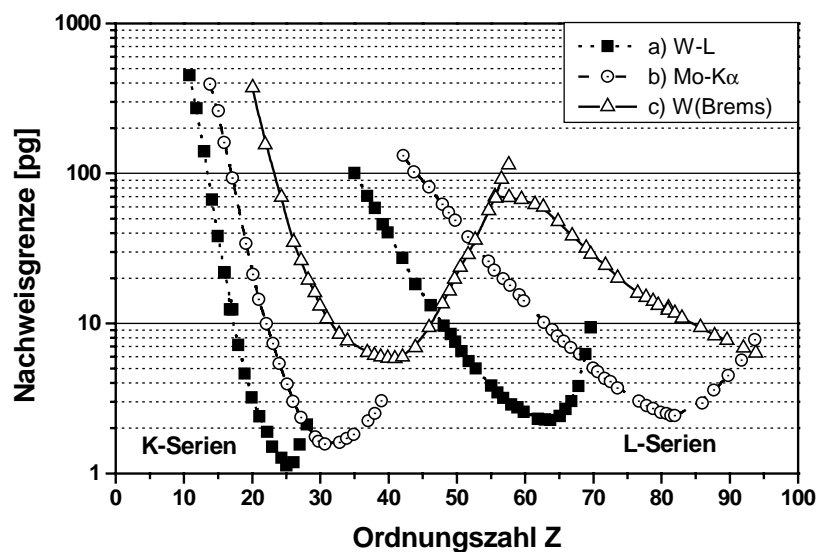


Abb. 2.4: Nachweisgrenzen der TXRF (Extra II A) für wässrigen Lösungen in Abhängigkeit der Ordnungszahl. Verwendete Anregungsmodi: a) W-Röhre, 25 kV; Cu-Filter (W-L-Anregung); b) Mo-Röhre, 50 kV; Mo-Filter, cutoff 20 keV (Mo-K α -Anregung); c) W-Röhre, 50 kV; Ni-Filter, cutoff 35 keV (W(Brems)-Anregung) [44, 45].

Für Übergangsmetalle werden Nachweisgrenzen bis in den pg-Bereich erreicht. Für das leichtere Element Schwefel (vgl. Kap. 2.1.5) liegen die Nachweisgrenzen in Abhängigkeit der Anregungsstrahlung bei etwa 20 pg (W-L α -Anregung, 8,4 keV) bzw. 0,20 ng (Mo-K α -Anregung, 17,4 keV).

2.1.4 Voraussetzungen und Grenzen

Die Bedeutung der TXRF liegt in der Ausbildung von stehenden Wellen über einer Oberfläche und in den oberflächennahen Schichten (Abschnitt 2.1.2). Interferenzen können störende Effekte auslösen. Um eine optimale Quantifizierung zu gewährleisten müssen bestimmte Voraussetzungen in Hinblick auf die Probenbeschaffenheit, insbesondere die der Schichtdicke und flächenbezogenen Masse innerhalb eines oberen und unteren Grenzbereiches, erfüllt sein.

1. Geometrielimitierung

Die Höhe des anregenden Röntgenstrahls beträgt 20 – 30 μm , die Höhe der dreiecksförmigen Region des stehenden Wellenfeldes 10 – 15 μm (vgl. Abb. 2.2). Somit ergibt sich anhand dieser Faktoren eine Beschränkung der Probendicke auf 15 μm .

2. Matrix-/Absorptionslimitierung

Eine weitere wichtige Einschränkung ist durch Absorptionseffekte der Probenmatrix bedingt. Bei Verwendung eines internen Standards können die Schwankungen in den Fluoreszenzintensitäten weitgehend durch das gebildete Intensitätsverhältnis kompensiert werden. Die kritische Schichtdicke d_{max} , bei der noch eine maximal zulässige Absorption von etwa 5 % auftritt, kann nach Gleichung 2.5 berechnet werden [46].

$$d_{\text{max}} = \frac{0,05 / \rho_{\text{matrix}}}{\left| \overline{(\mu/\rho)}_x - \overline{(\mu/\rho)}_{\text{is}} \right|} \quad \text{Gl. 2.5}$$

ρ_{matrix} : Dichte der Matrix

$\overline{(\mu/\rho)}$: totaler Massenabsorptionskoeffizient, beinhaltend die Massenabsorptionskoeffizienten der Primäranregung E_0 und der emittierten Fluoreszenzstrahlung E_x des Analyten x , sowie den Einfallswinkel φ :

$$\overline{(\mu/\rho)} = c_x [(\mu/\rho)_{x,E_0} / \varphi + (\mu/\rho)_{x,E_x}]$$

Dadurch können bei Verwendung des internen Standards die in Tab. 2.1 und Abb. 2.5 ermittelten kritischen Schichtdicken d_{max} bei konstanter Probenmasse das zehnfache bis

hundertfache noch übersteigen. Die Voraussetzung ist auch hier wieder die homogene Verteilung der Analyten und des internen Standards in der Probe.

Matrix	organisches Gewebe	mineralisches Pulver	metallischer Abrieb
Elemente	${}^1\text{H} \dots {}^8\text{O}$	${}^8\text{O} \dots {}^{20}\text{Ca}$	${}^{24}\text{Cr} \dots {}^{30}\text{Zn}$
Dichte	ca. $0,2 \text{ g/cm}^3$ ⁽¹⁾	ca. 2 g/cm^3	ca. 8 g/cm^3
d_{max}	$4 \mu\text{m}$	50 nm	2 nm
m_{max}	$250 \mu\text{g/cm}^2$	$140 \mu\text{g/cm}^2$	$8 \mu\text{g/cm}^2$

Tab. 2.1: Kritische Schichtdicke (d_{max}) und kritische Probenmasse (m_{max}) von „unendlich“ dünnen Schichten oder Filmen unterschiedlicher Matrix für Mo-K α -Anregung [46].

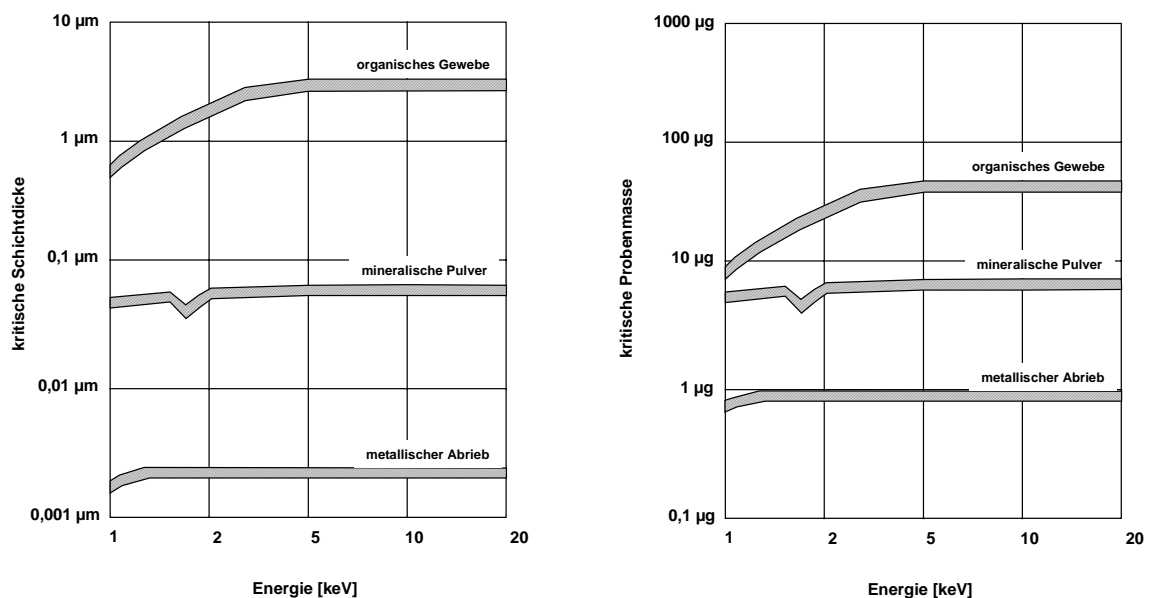


Abb. 2.5: Kritische Schichtdicke (links) und kritische Probenmasse (rechts) von „unendlich“ dünnen Schichten oder Filmen unterschiedlicher Matrix in Abhängigkeit von der Energie der detektierten Fluoreszenzstrahlung für Mo-K α -Anregung [46].

Eine minimale Schichtdicke und flächenbezogene Probenmasse ist zum einen durch die Nachweisgrenze und zum anderen durch die Höhe des ersten Schwingungsbandes (vgl. Abb. 2.2) des erzeugten stehenden Wellenfeldes gegeben [47]. Für Probenträger aus Quarzglas ergeben sich somit minimale Schichtdicken von ungefähr 15 nm , sowie eine Mindestprobenmasse von 15 pg/cm^2 [39].

¹ bezogen auf Trockenmasse

2.1.5 TXRF von leichten Elementen – Einführung in die Problematik

Die Bestimmung von leichten Elementen ist eine Herausforderung für die Röntgenfluoreszenzanalyse. Die emittierte charakteristische Fluoreszenzstrahlung ist für leichte Elemente nur von sehr geringer Energie (< 2 keV für $Z \leq 14$). Die Intensität der Fluoreszenzlinien wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst:

$$I_{K\alpha} \propto I_0 G \tau_K \omega_K \varepsilon_K p_\alpha \quad \text{Gl. 2.6}$$

$I_{K\alpha}$: Fluoreszenz-Intensität der K_α -Linie

I_0 : Intensität der Primärstrahlung

G: Geometriefaktor

τ_K : photoelektrischer Massenabsorptionskoeffizient der K-Schale

ω_K : Fluoreszenzausbeute

ε : Detektor-Wirkungsgrad

p_α : Übergangswahrscheinlichkeit

Die Fluoreszenzausbeuten ω und der photoelektrische Massenabsorptionskoeffizient τ nehmen mit abnehmender Ordnungszahl Z stark ab. Für Natrium (Na- K_α : 1,041 keV) beträgt die Fluoreszenzausbeute $\omega_{\text{Na}} = 0,023$, für Schwefel (S- K_α : 2,307 keV) ist $\omega_{\text{S}} = 0,078$ (im Vergleich $\omega_{\text{Fe}} = 0,34$). Die emittierten Fluoreszenzintensitäten leichterer Elemente liegen daher um drei bis vier Größenordnungen unter denen der Übergangselemente. Überdies sind die Fluoreszenzintensitäten in Gl. 2.6 abhängig von der Konzentration des leichten Elementes und von einem Absorptionsterm, der die Schichtdicke der Probe beinhaltet. Einer der Hauptcharakteristika der TXRF ist allerdings die Tatsache, dass Absorptionseffekte aufgrund der geringen Probenmengen im allgemeinen vernachlässigt werden können. Für gewöhnlich ist dann die Dünnschicht-Näherung gültig. Nur bei niederenergetischen Fluoreszenzstrahlungen müssen unter Umständen Absorptionseffekte berücksichtigt werden. Berechnungen der Informationstiefe der Fluoreszenzstrahlungen an Trockenrückständen ergaben für eine hypothetische Probe der Zusammensetzung Kohlenstoff, Sauerstoff je 30 %, Natrium, Silicium, Chlor und Calcium je 10 % für die Al- K_α -Fluoreszenzstrahlung (Al- K_α : 1,487 keV) eine Informationstiefe⁽²⁾ von 5 μm [48]. Neben Absorptionseffekten durch die Probenmatrix kommen noch solche durch Luft und Detektorfenster hinzu.

Die meisten der aufgeführten Probleme sind untrennbar mit der energiedispersiven Röntgenfluoreszenzanalyse verbunden. Deutliche Verbesserungen bei der Bestimmung von leichten Elementen können nur durch spezifische Veränderungen in der Spektrometer-

² Die Informationstiefe ist definiert als der reziproke lineare Absorptionskoeffizient der Probe

instrumentation erreicht werden, z. B. die Verwendung von Vakuumkammern, Multilayern und fensterlosen oder dünneren Detektorfenstern [49-54]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der effektiveren Anregung der Probe. Der Anregungsquerschnitt ist dann groß, wenn die charakteristische Photonenenergie des verwendeten Anodenmaterials der Röntgenröhre nicht viel größer ist als die Energie der Absorptionskante des Analyten (etwa um den Faktor drei bis fünf). Dadurch können die Nachweisgrenzen um einige Größenordnungen verbessert werden. In Tab. 2.2 sind die Nachweisgrenzen für einige Elemente, die mittels W-L α - und Mo-K α -Anregungsstrahlung erhalten werden, zusammengefasst.

Element	Anregungsstrahlung		
	W-L α	Mo-K α	W(Brems)
Na	400	--	--
Mg	180	--	--
Al	85	--	--
Si	40	--	--
P	22	--	--
S	12	200	--
Cl	7,2	130	--
K	3,4	50	--
Ca	2,4	27	--
Ti	1,7	14	--
V	1,6	11	--
Cr	1,5	8,2	80
Mn	1,6	5,8	60
Fe	1,9	4,5	42

Tab. 2.2: TXRF-Nachweisgrenzen [pg] für drei verschiedene Anregungsmodi: a) W-L α -Anregung, 8,4 keV (W-Röhre, 25 kV; Cu-Filter); b) Mo-K α -Anregung, 17,44 keV (Mo-Röhre, 50 kV; Mo-Filter, cutoff 20 keV); c) W(Brems)-Anregung (W-Röhre, 50 kV; Ni-Filter, cutoff 35 keV) [55].

Abb. 2.6 zeigt einige weitere in der Praxis verwendete Anodenmaterialien und ihre Anregungsquerschnitte in Abhängigkeit von der Ordnungszahl Z. Die Anregung mit Cr-K α - oder Sc-K α -Röntgenröhren (mit dünneren Austrittsfenstern oder fensterlos) ist für die Analyse der leichten Elemente am empfehlenswertesten. Hierdurch konnten bereits Nachweisgrenzen von 0,4 ng Magnesium oder 0,5 ng Natrium erreicht werden [52]. Eine weitere deutliche Verbesserung der Nachweisgrenzen kann durch die Verwendung von Synchrotronstrahlung erzielt werden. Aufgrund ihrer hohen Intensität und eines weiten spektralen Bereiches ist die Synchrotronstrahlung eine ideale Anregungsquelle für die TXRF, durch die sich Nachweisgrenzen von 0,5 pg Aluminium bzw. 2 pg Magnesium erzielen lassen [54].

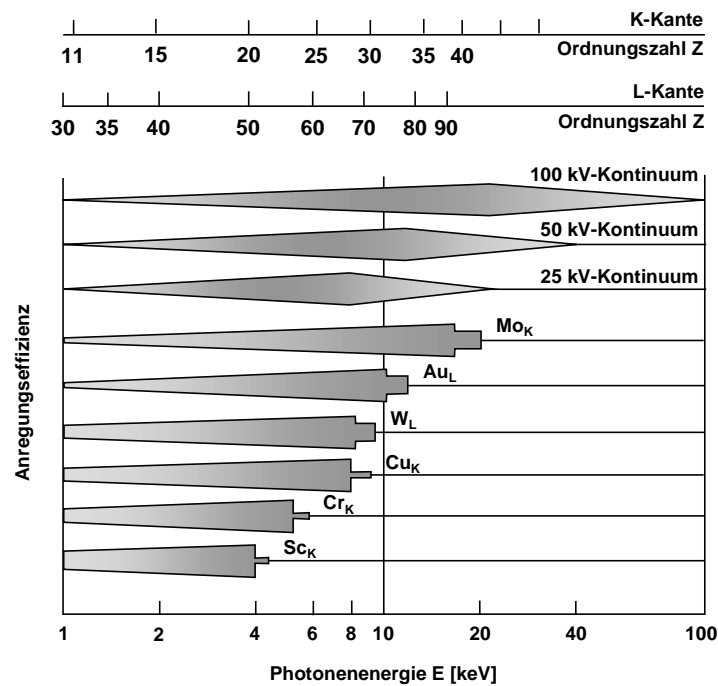


Abb. 2.6: Anregungseffizienz in Abhängigkeit von der Photonenenergie bzw. der Ordnungszahl. Die beiden oberen Skalen zeigen die energetische Lage der K- und L-Absorptionskanten. Die Anregung erfolgt über die Kontinuumstrahlung (100, 50, 25 kV) oder durch die K- bzw. L-Linien verschiedener Röntgenröhren (Mo, Au, W, Cu, Cr, Sc).

2.1.6 Gerätespezifikation

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde ein TXRF-Spektrometer der Firma ATOMIKA Instruments GmbH (Spektrometertyp Extra II A) verwendet. Das TXRF-Spektrometer ist ausgestattet mit 2 Anregungseinheiten (2 kW Fein-Fokus-Röntgenröhren: W und Mo), einem Quarzglas-Spiegel als Tiefpassfilter und einem Si(Li)-Halbleiterdetektor mit einer wirksamen Oberfläche von 80 mm^2 (Energieauflösung 168 eV bei 5,9 keV (Mn-K α)). Nähere Gerätespezifikationen wie die verwendeten Anregungsmodi, Einfallswinkel, Filter, ... sind in Tab. 2.3 zusammengestellt. Alle Messungen wurden unter Atmosphärendruck an Luft durchgeführt.

Röhre / Modus	W-L α	Mo-K α	W(Brems)
Energie	8,38 keV	17,55 keV	40 keV
Einfallswinkel	0,05°	0,09°	0,05°
Strom / Spannung	25 kV / 5 - 60 mA	50 kV / 5 - 38 mA	50 kV / 5 - 38 mA
"dünner Filter" (1)	10 μm Cu	50 μm Mo	100 μm Ni
"dicker Filter" (2)	30 μm Cu	200 μm Mo	300 μm Ni

Tab. 2.3: Gerätespezifikationen des verwendeten TXRF-Spektrometers Extra II A.

2.2 ALPHA-Step

Der *ALPHA*-Step ist ein Gerät zur Erfassung von Stufenhöhen bzw. zur Darstellung von Oberflächentopographien (Sigmoidal Plot) [56]. Dabei wird die zu untersuchende Probe

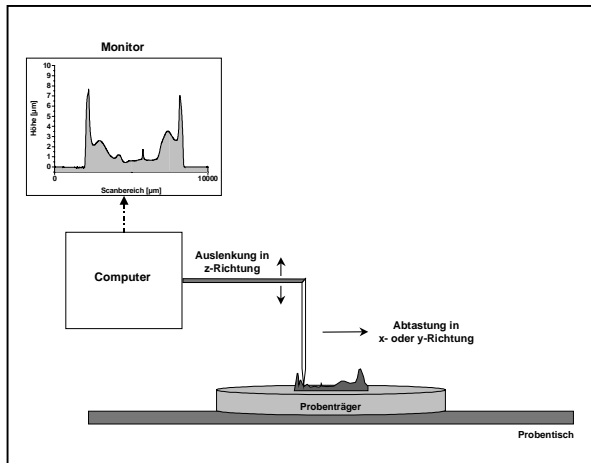


Abb. 2.7: Schematischer Aufbau und Funktionsweise eines *ALPHA*-Steps.

mittels einer Nadel in x- oder y-Richtung abgetastet. Die durch das Abtasten erfassten Änderungen der Topologie verursachen eine Auslenkung der Nadel in z-Richtung. Die Ablenkungen werden registriert und verfolgt, wobei bis zu 2.000 Datenpunkte erfasst werden können. Mit dem *Alpha*-Step sind Messungen von Oberflächenprofilen im Bereich von 20 nm bis 160 µm möglich; die Auflagekraft der Nadel kann zwischen 1 bis 25 mg variiert werden. Dadurch besteht auch die Möglichkeit der Untersuchung von weicheren

Proben. Die Scanlänge beträgt maximal 10 cm. Es werden Höhenauflösungen im Bereich von 40 nm erreicht.

Gerätespezifikationen

Die Oberflächentopographien wurden mit einem *ALPHA*-Step der Firma Tencor Instruments (Gerätetyp: *ALPHA*-Step 200) aufgenommen. Für alle Aufnahmen wurde eine Scanlänge von 10 mm gewählt. Die Dauer einer Messung betrug 40 s bei einer erreichbaren Höhenauflösung von 50 nm. Die Auflagekraft der Nadel betrug 5 mg.

2.3 Rasterelektronenmikroskopie

Das Rasterelektronenmikroskop (REM oder Scanning Electron Microscope, SEM) dient im wesentlichen der Abbildung der Topographie rauher Oberflächen mit einer großen Schärfentiefe und hoher Auflösung [57]. Daneben können bei entsprechenden Proben Materialunterschiede (Materialkontrast), Kristallorientierungen (Channelingkontrast), elektrische Potentiale (Potentialkontrast) oder Magnetfelder (Magnetkontrast) dargestellt werden. Zusätzlich zu diesen vielfältigen Abbildungsarten bietet die Rasterelektronenmikroskopie die Möglichkeit zur Durchführung von Mikrobereichsanalysen ($\varnothing \approx 1 \mu\text{m}$). Durch die simultane Erzeugung charakteristischer Röntgenstrahlung können dabei Angaben über die Elementverteilung in diesem Bereich gemacht werden (Röntgen-Mikrobereichsanalyse, RMA, EDX).

Die für die Erzeugung des REM-Bildes notwendigen Signale werden durch Wechselwirkungsprozesse eines die Probenoberfläche abstrahlenden Elektronenstrahls mit der Probenmaterie geliefert. Die durch Sekundärelektronen oder Rückstreuelektronen entstandenen Signale werden von Detektoren registriert und nach elektronischer Verarbeitung (Kontrast-, Helligkeitsmodulation) dargestellt. Das REM liefert somit ein synthetisches Abbild der Wechselwirkungsprozesse zwischen dem auftreffenden Elektronenstrahl und einem bestimmten Bereich an der Probenoberfläche. Voraussetzung ist allerdings eine elektrische Leitfähigkeit der Probe, da sonst an der Probenoberfläche durch den Elektronenbeschuss negative Raumladungen ausgebildet werden, die die Abbildung beeinträchtigen. Daher werden nichtleitende Proben entweder mit einer leitfähigen Metall- oder Kohleschicht überzogen oder mit einer niedrigen Beschleunigungsspannung abgebildet. Eine andere Möglichkeit stellt die Ladungsneutralisation mit positiven Ionen dar (ECO-SEM-Modus: kontrollierte Zufuhr von z.B. Stickstoff) [58].

Gerätespezifikationen

Für die Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurde ein 1920 ECO-SEM der Firma AMRAY, Inc. verwendet. Für alle Messungen wurde eine Beschleunigungsspannung von 20 kV gewählt. Der Kippwinkel der Probenhalterung wurde in Abhängigkeit der gewünschten Bildansicht 20° oder 90° (Seitenansicht) gesetzt. Der Stickstoffdruck des ECO-SEM-Modus betrug zwischen 50 und 200 mTorr.

KAPITEL III

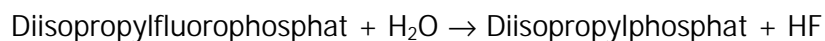
Präparativer Teil Enzymanalytik

3.1 Untersuchte Enzyme

Im Folgenden sollen zunächst die isolierten Enzyme vorgestellt werden, die im Rahmen dieser Arbeit vorrangig untersucht wurden.

3.1.1 Diisopropylfluorophosphatase (DFPase)

Die DFPase katalysiert die Hydrolyse von stark toxischen Organophosphaten wie Diisopropylfluorophosphat, Soman, Tabun, Sarin und Cyclohexylsarin. Durch Spaltung der Phosphoranhydridbindungen während des katalytischen Prozesses kommt es zum Verlust der Toxizität der Organophosphate:



Bei der Suche nach Methoden zur Entsorgung dieser Verbindungen stellt die auf diesem Wege mögliche enzymatische Dekontamination eine umweltverträgliche, effiziente und kostengünstige Alternative im Vergleich zu chemischen Methoden dar.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte DFPase wurde ursprünglich aus den Kopfganglien des Tintenfischs *Loligo vulgaris* isoliert. Da für enzymatische Dekontaminationen allerdings größere Mengen an rekombinantem Enzym benötigt werden, wurde das Enzym durch Expression in *Escherichia coli* und *Pichia pastoris* gentechnisch hergestellt. Die DFPase besitzt ein Molekulargewicht von 35 kDa. Basierend auf der Aminosäuresequenzanalyse besitzt das Enzym 16 schwefelhaltige Aminosäuren (8 Cysteine, 8 Methionine). Als Metall-Cofaktoren konnten anhand von TXRF-Messungen zwei Calcium-Atome bestimmt werden, wobei zwischen einem niederaffin und einem höheraffin gebundenen Calciumion unterschieden werden konnte [59]. Die Untersuchungen an der DFPase waren Bestandteil eines Projektes in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Rüterjans (Eileen Ilona Scharff), Institut für biophysikalische Chemie, Universität Frankfurt. Die Bestimmung der DFPase-Konzentration vorliegender reiner Proben erfolgte über die UV-Absorptionsspektroskopie. Die Absorptionsspektren wurden im Wellenlängenbereich von 240 - 320 nm aufgenommen [59, 60].

3.1.2 NADH:Q Oxidoreduktase (Komplex I)

Die NADH:Q Oxidoreduktase (NADH:Ubichinon Oxidoreduktase, Komplex I) ist der erste und der größte der vier membranständigen Elektronentransportkomplexe der mitochondrialen Atmungskette. Das Enzym katalysiert die Übertragung von zwei Elektronen vom Nicotinamidadenindinucleotid (NADH) auf Flavinmononucleotid (FMN), der ersten prosthetischen Gruppe des Enzyms. Die Elektronen werden anschließend vom FMNH₂ über eine Reihe von Eisen-Schwefel-Clustern (Fe-S-Cluster), dem zweiten Typ redoxaktiver prosthetischer Gruppen im Komplex I, abschließend auf das Ubichinon (Coenzym Q) übertragen [61].

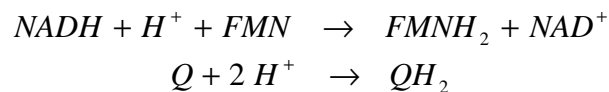
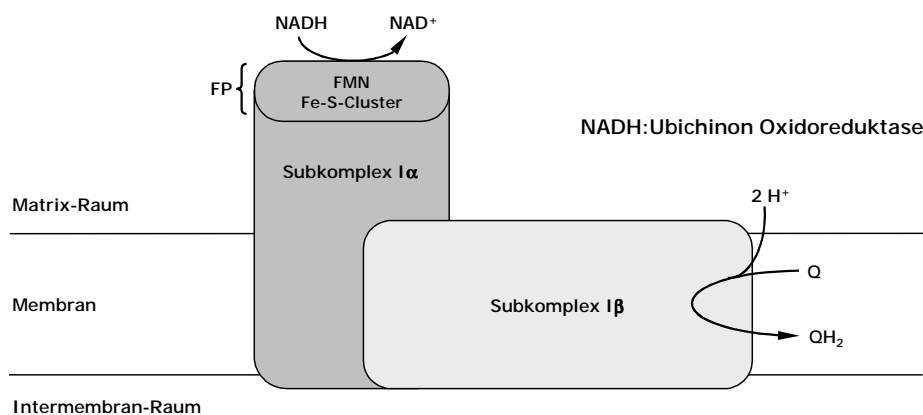


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Komplex I aus Rinderherzmitochondrien mit katalysiertem Reaktionsablauf [61, 62].

Über den genauen katalytischen Mechanismus sowie genaue strukturelle Eigenschaften des Komplex I ist bisher wenig bekannt. Der untersuchte Komplex I aus Rinderherzmitochondrien ist aus 43 Untereinheiten aufgebaut und besitzt ein Molekulargewicht von rund 1.000 kDa. Insgesamt enthält er rund 8.000 Aminosäuren. Der Schwefelgehalt aus den schwefelhaltigen Aminosäuren ist aus den Sequenzen der 42 Untereinheiten bekannt. Von der 43. Untereinheit liegt noch keine Sequenz vor, so dass von etwa 428 Schwefel pro Komplex I ausgegangen wird. Hinzu kommt der säurelabile, anorganische Schwefel aus den Fe-S-Clustern. Es werden mindestens acht Fe-S-Motive postuliert. Mit der Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR) können bisher zwei binukleare und vier tetranukleare Fe-S-Cluster nachgewiesen werden, wobei allerdings nicht auszuschließen ist, dass noch weitere, für das ESR nicht detektierbare, Fe-S-Cluster existieren können. Somit werden nach den ESR-Daten 20 Eisen pro Komplex I als Metall-Cofaktoren erwartet [63]. Die Un-

tersuchungen am Komplex I waren Bestandteil eines Projektes in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Brandt (Volker Zickermann, Jürgen Okun), Gustav-Emden-Zentrum für biologische Chemie, Institut für Biochemie I, Universitätsklinikum Frankfurt. Die jeweiligen Komplex I Konzentrationen der Proben wurden über die Proteinbestimmung nach Lowry mit der Modifikation von Helenius & Simons ermittelt [22, 24, 62].

3.1.3 Cytochrom *c* Oxidase

Die Cytochrom *c* Oxidase stellt den letzten der vier elektronenübertragenden Komplexe in der mitochondrialen Atmungskette dar. Das Enzym katalysiert die Reduktion von elementarem Sauerstoff zu Wasser und ist an einen Protonentransport über die Membran gekoppelt.

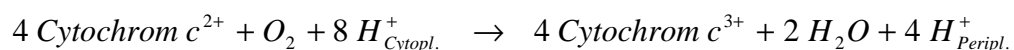
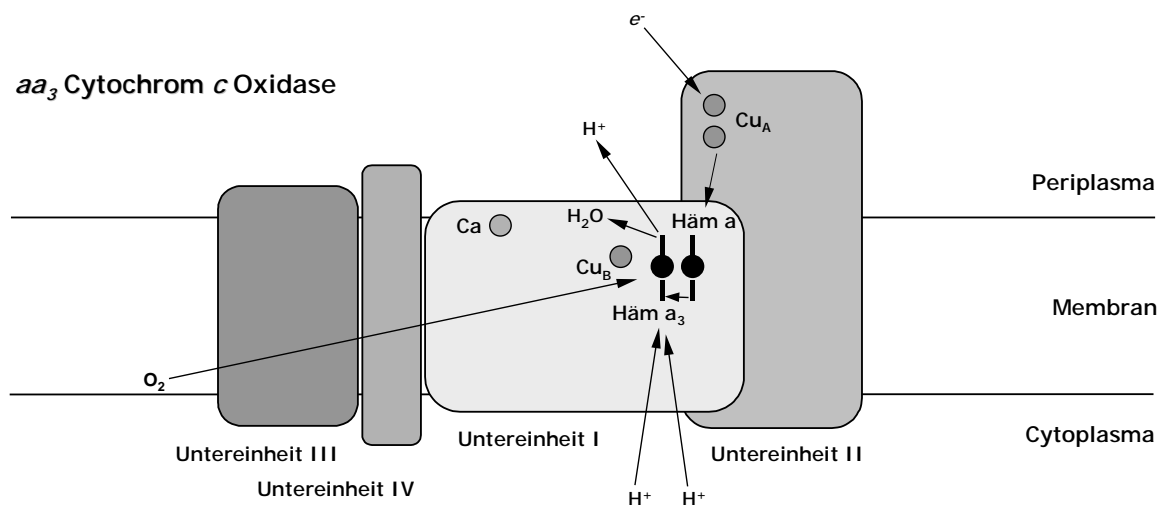


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Cytochrom *c* Oxidase vom Häm *aa₃*-Typ aus *Paracoccus denitrificans* mit katalysiertem Reaktionsablauf [64].

Die Cytochrom *c* Oxidase aus dem gram-negativen Bodenbakterium *Paracoccus denitrificans* besteht aus insgesamt vier Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 126 kDa [65]. Das Enzym enthält insgesamt 1.132 Aminosäuren, davon 54 schwefelhaltige (17 Cysteine, 37 Methionine), und benötigt für seine katalytische Funktion redoxaktive Co-faktoren. Zwei Häm-gebundene Eisen-Ionen (ein low-spin Häm *a* und ein high-spin Häm *a₃*) und ein Kupfer-Ion (Cu_B -Zentrum) sind in der Untereinheit I lokalisiert, zwei weitere Kupfer-Ionen (Cu_A -Zentrum) in der Untereinheit II. Das high-spin Häm *a₃* und das Cu_B -Zentrum bilden zusammen das binukleäre Zentrum. Neben den redoxaktiven Metallzen-

tren besitzt die Cytochrom *c* Oxidase eine redoxinaktive Metall-Bindungsstelle noch unbekannter Funktion zwischen den Untereinheiten I und II [66, 67]. Diese Bindungsstelle ist in der Regel durch ein Magnesium-Ion besetzt. Im *Paracoccus* Enzym sind dagegen typischerweise 20 % mit Mangan-Ionen besetzt [68]. Die Existenz eines weiteren Cofaktors war nach der Verfeinerung der Strukturdaten bekannt. Die Natur und die Stöchiometrie dieses ebenfalls nicht redoxaktiven Cofaktors – Calcium - an der periplasmatischen Oberfläche der Untereinheit I und die an der Ligandierung dieses Cofaktors wesentlich beteiligten Aminosäuren konnten anhand von TXRF-Messungen erst kürzlich ermittelt werden [69]. Die Untersuchungen an der Cytochrom *c* Oxidase waren Bestandteil von Projekten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Ludwig (Ute Pfitzner), Institut für Biochemie, Universität Frankfurt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der gereinigten Enzymproben erfolgte nach der Methode von Lowry [22, 23, 64].

3.2 Allgemeiner Präparationsablauf

Im Folgenden soll kurz auf den allgemeinen Präparationsablauf bei der TXRF-Analyse von Enzymproben eingegangen werden. Spezielle Präparationsverfahren zur Evaluierung der TXRF für die Elementbestimmung in Enzymen werden in den einzelnen Kapiteln beschrieben.

Enzym	Pufferzusammensetzung
DFPase	2 mM Tris/Acetat ⁽¹⁾ , pH 7,5
Cytochrom <i>c</i> Oxidase	50 mM Tris/Acetat ⁽¹⁾ , 1 mM EDTA, 0,2 g/l Dodecylmaltosid (DM), pH 7,4
Komplex I	50 mM Tris/Acetat ⁽¹⁾ , 1 mM EDTA, 0,1 % Dodecylmaltosid (DM), pH 7,4

Tab. 3.1: Verwendete Pufferzusammensetzungen.

Nach der Isolierung und Reinigung werden die zu untersuchenden Enzyme üblicherweise in anorganischen Salzpuffern gelagert. Diese Puffersysteme, die für die Stabilisierung der Enzymstrukturen unabdingbar sind, weisen für TXRF Untersuchungen zu hohe Salzgehalte auf. Dies führt zu einer drastischen Erhöhung des Messuntergrundes, sowie zu Signalüberlagerungen zwischen detektierbaren Pufferelementen und den zu detektierenden Elementen des Enzyms. Aus diesem Grund müssen die Enzyme zuvor in ein geeigneteres Puffersystem überführt werden. Tris/Acetat-Puffer⁽¹⁾ haben sich hierbei als am besten geeignet erwiesen, da diese Systeme eine rein organische Matrix mit für die TXRF nicht

¹ Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)-acetat

detektierbaren Elementkomponenten besitzen [70]. Tab. 3.1 gibt einen Überblick über die Pufferzusammensetzungen für die TXRF-Analysen der DFPase, Cytochrom *c* Oxidase und des Komplex I.

Für die TXRF-Messungen wurde jeweils ein aliquoter Anteil der zu untersuchenden Enzymlösung mit einem internen Standard versetzt (Probe : interner Standard = 10 : 1). In Abhängigkeit von den zu erwartenden Elementzusammensetzungen wurde, um Signalüberlagerungen weitestgehend zu vermeiden, entweder eine 1:1 Lösung aus Cr/Rb oder Mn/Rb (10 – 100 mg/l) als interner Standard verwendet. Je 4 µl der mit dem internen Standard versetzten Enzymlösungen wurden anschließend auf Quarzglasprobenträger aufgebracht. Dabei wurden in der Regel drei- oder vierfach Bestimmungen vorgenommen. Zur Entfernung des Lösungsmittels wurde auf den üblichen Weg mittels Wärmezufuhr auf einer Heizplatte oder unter der IR-Lampe verzichtet. Nach einem Vergleich verschiedener alternativer Trocknungsmethoden auf die Rückstandsbildung und die Elementdetektion wurde die Trocknung an Luft bei Raumtemperatur bevorzugt (s. Kapitel V). Alle für die TXRF-Analysen notwendigen Präparationsschritte erfolgten unter Laminarboxen. Anschließend wurden die Proben mit TXRF unter folgenden Standardmessbedingungen vermessen: W-L α -Anregung für die Bestimmung von leichten Elementen (i. d. R. Schwefel und Calcium), sowie Mo-K α -Anregung für die Bestimmung der Übergangsmetalle. Teilweise war aufgrund hoher Totzeiten eine Bestimmung der leichten Elemente mit W-L α -Anregung nicht möglich, so dass die Auswertung hier über die Mo-K α -Anregung erfolgen musste. Bei Molybdän-haltigen Enzymproben kam noch die W(Brems)-Anregung zum Einsatz. Die Messzeit betrug dabei jeweils 1.000 s.

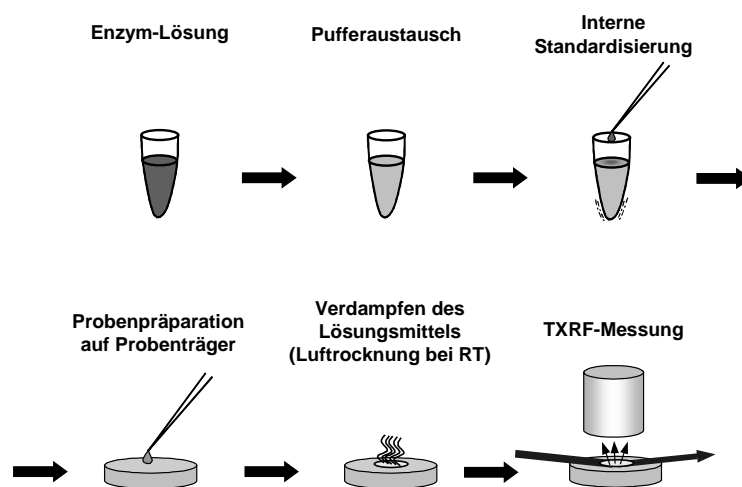


Abb. 3.3: Allgemeine Probenvorbereitung für die Analyse von Proteinen und Enzymen mit TXRF.

KAPITEL IV

Überprüfung der relativen Empfindlichkeitsfaktoren

Die Kalibrierung ist der wichtigste Schritt für die Quantifizierung eines Analysenverfahrens. Spektrochemische Verfahren sind Relativmethoden, die die Erstellung von Kalibrierfunktionen erfordern. Für die quantitative Auswertung der TXRF-Analyse sind die sogenannten relativen Empfindlichkeitsfaktoren, auch Kalibrierfaktoren genannt, eine wichtige Voraussetzung, um den unterschiedlichen Empfindlichkeiten der Fluoreszenzintensitäten Rechnung zu tragen.

Idealerweise besteht bei Anregung durch Röntgenstrahlung unter fest vorgegebenen Messbedingungen ein linearer Zusammenhang zwischen der Masse m_x bzw. der Konzentration c_x eines Elementes und der Intensität der detektierten Röntgenstrahlung N_x :

$$N_x = B_x \cdot c_x \quad \text{Gl. 4.1}$$

N_x : Netto-Intensität des Elementes x

B_x : Proportionalitätsfaktor: absolute Empfindlichkeit

c_x : Volumenkonzentration des Elementes x

Die graphische Darstellung der Netto-Intensitäten vs. Konzentration nach Gleichung 4.1 ergibt eine Gerade, deren Steigung durch den Proportionalitätsfaktor B_x gegeben ist. Die verschiedenen Elemente weisen eine Ordnungszahl-abhängige Steigung B_x bzw. eine Ordnungszahl-abhängige absolute Empfindlichkeit auf. Das Verhältnis dieser absoluten Empfindlichkeiten zu einem Referenzelement wird relative Empfindlichkeit genannt und kann über eine Kalibrierung bestimmt werden. In der Regel ist dies eine einmalige Kalibrierung für jede der zur Verfügung stehenden Anregungsarten und verwendeten Filter, solange nicht grundlegende bauliche Veränderungen (z. B. Geometrie, Anregungsart, ...) an dem TXRF-Spektrometer vorgenommen werden. Die relativen Empfindlichkeitsfaktoren bzw. Kalibrierfaktoren für die verschiedenen Anregungsarten und Filter werden bei Kauf eines Spektrometers vom Gerätehersteller mitgeliefert. Da die Kalibrierfaktoren für den W-L α -Modus fehlten, wurden diese von einem anderen TXRF-Spektrometer Extra II A übernommen. Dieses Verfahren ist für TXRF-Spektrometer gleichen Bautyps und bei gleicher Anregung zulässig und in der Literatur beschrieben [39, 71]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Überprüfung der Kalibrierfaktoren für W-L α - und Mo-K α -Anregung an ausge-

wählten Elementen durchgeführt. Zusätzlich wurden für das leichte Element Schwefel die Auswirkungen verschiedener Schwefelstandardlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen auf die relativen Empfindlichkeitsfaktoren untersucht.

4.1 Bestimmung der relativen Empfindlichkeitsfaktoren

Für die praktische Bestimmung der Kalibrierfaktoren wurden verschiedene Standardlösungen durch Verdünnung kommerziell erhältlicher AAS-Standardlösungen verwendet. Jeder dieser Standardlösungen wurde ein Referenzelement gleicher Konzentration zugesetzt. Um die experimentell neu bestimmten Faktoren direkt mit den bereits in der Geräte-Software vorinstallierten Kalibrierfaktoren vergleichen zu können, wurden die dort in den einzelnen Moden bereits festgelegten Referenzelemente verwendet (Cr als Referenzelement für den W-L α -Modus; Co für den Mo-K α -Modus). Für Analyt-Elemente, deren Peaks sich mit denen der Referenzelemente überlagern, wurde umgekehrt Co (bei W-L α) bzw. Cr (bei Mo-K α) als Referenzelement eingesetzt. Die Konzentration dieser so hergestellten Kalibrierlösungen sollte nicht zu niedrig gewählt werden. Ideale Konzentrationen liegen im Bereich von 1 - 10 mg/l. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Konzentration von 1 mg/l (entsprechend 10 ng absolut) gewählt. Anschließend wurde ein Aliquot von 10 μ l auf einem Quarzprobenträger aufgebracht und unter Wärmezufuhr eingetrocknet. Für statistische Zwecke wurden jeweils 5 Proben für jede Elementkombination hergestellt.

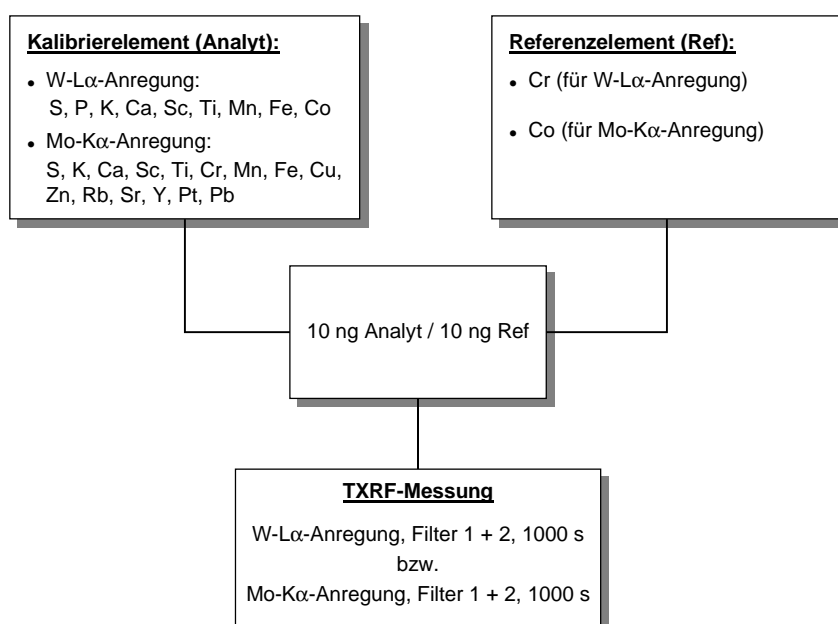


Abb. 4.1: Probenpräparation zur experimentellen Bestimmung der relativen Empfindlichkeitsfaktoren für W-L α - und Mo-K α -Anregung.

Aus den aufgenommenen Spektren wurden die Netto-Intensitäten der einzelnen Elemente bestimmt und die relativen Empfindlichkeitsfaktoren nach Gleichung 4.2 berechnet. Dem Referenzelement wird willkürlich ein relativer Empfindlichkeitsfaktor von 1 zugeordnet.

$$S_x = \frac{N_x / c_x}{N_{rf} / c_{rf}} S_{rf} \quad \text{Gl. 4.2}$$

S_x : relative Empfindlichkeit des zu kalibrierenden Elements x

S_{rf} : relative Empfindlichkeit des Referenzelements rf (= 1)

N_x : Netto-Intensität des zu kalibrierenden Elements x

N_{rf} : Netto-Intensität des Referenzelements rf

C_x : Konzentration des zu kalibrierenden Elements x

c_{rf} : Konzentration des Referenzelements rf

Abb. 4.2 zeigt die Vergleiche der hier experimentell bestimmten mit den bereits in der Geräte-Software vorinstallierten („vorhandenen“) relativen Empfindlichkeitsfaktoren für die beiden Anregungsmodi W-L α und Mo-K α in halblogarithmischen Darstellungen. Die unterschiedlichen relativen Empfindlichkeiten S der einzelnen Elemente machen sich in den TXRF-Spektren durch verschiedene Signalintensitäten (Zählraten) bemerkbar. Man erhält dabei für die emittierten Fluoreszenzstrahlungen der K- und L-Linien je einen eigenen Kurvenverlauf. Die experimentell bestimmten Werte stimmen für die meisten der untersuchten Elemente sehr gut mit denen der bereits vorinstallierten überein. Dies konnte für beide Anregungsmodi festgestellt werden. Die Abweichungen bewegen sich hierbei im Durchschnitt zwischen 2 und 5 %. Nur bei den beiden leichten Elementen Phosphor und Schwefel liegen die experimentell ermittelten Werte für W-L α -Anregung um 10 – 25 % unterhalb der vorinstallierten Werte. Bei Verwendung der Mo-K α -Anregungsstrahlung wurden dagegen Faktoren für Schwefel bestimmt, die etwa 30 % oberhalb der vorhandenen Werte liegen.

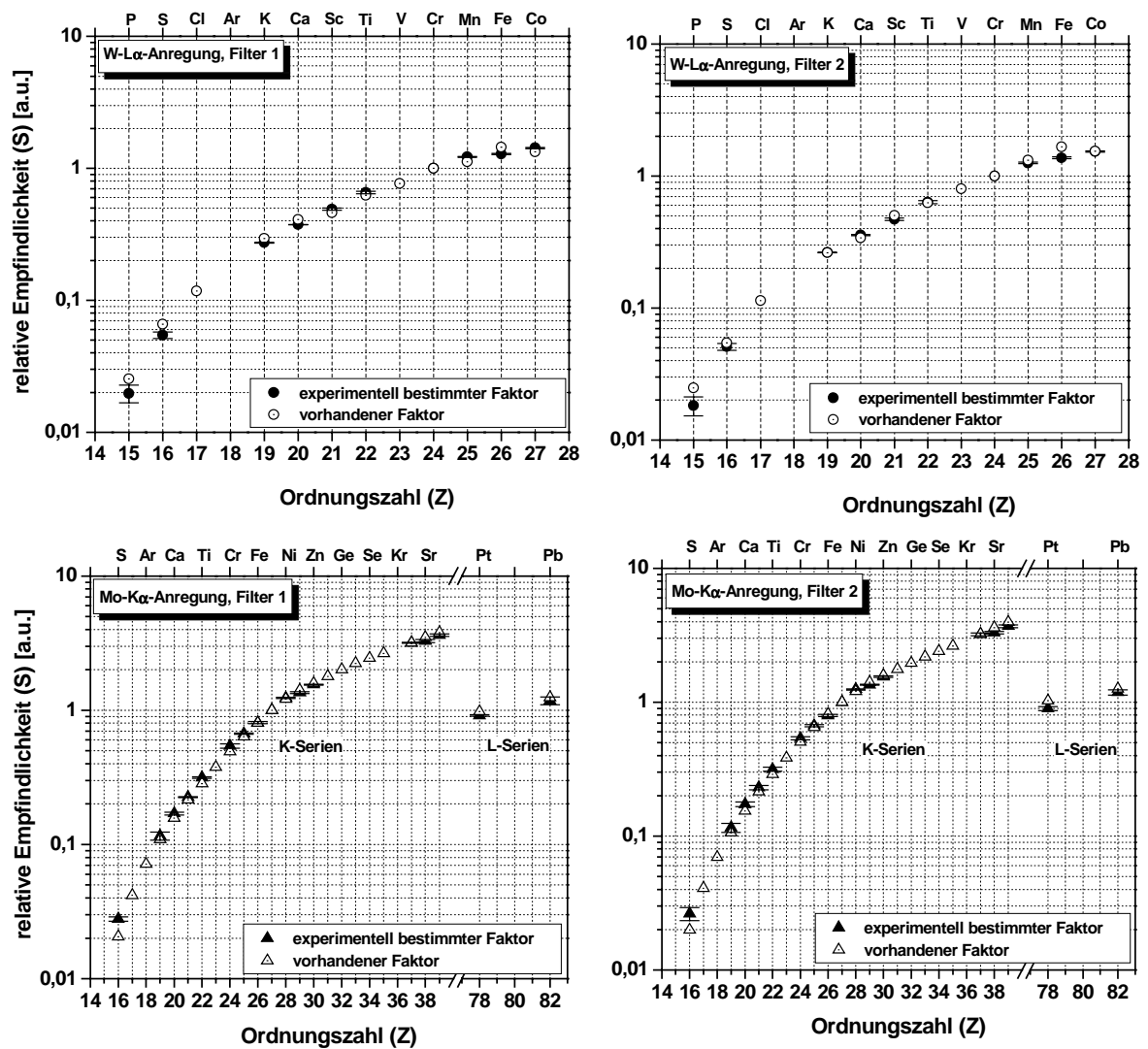


Abb.4.2: Relative Empfindlichkeitsfaktoren (Kalibrierfaktoren) in Abhängigkeit von der Ordnungszahl (Z). Vergleich der hier experimentell bestimmten zu den in der Geräte-Software vorinstallierten Faktoren („vorhandener Faktor“) für den W-L α - und Mo-K α -Anregungsmodus (Filter 1 und 2). Die Elemente wurden über ihre jeweiligen K- bzw. L-Linien bestimmt.

4.2 Matrix-/Konzentrationsabhängigkeit des relativen Empfindlichkeitsfaktors für das Element Schwefel

Die relativen Empfindlichkeitsfaktoren werden unter Idealbedingungen bestimmt, d.h. unter Benutzung von wässrigen Standardlösungen, die nur das zu kalibrierende Element und das Bezügelement enthalten. Wie in der Literatur beschrieben [39] lassen sich die Faktoren auch theoretisch unter Einbeziehung von Fundamentalparametern wie folgt ableiten:

$$S_x = K \cdot g_x \cdot \omega_x \cdot f_x \cdot \left(\frac{\tau}{\rho} \right)_{x, E_0} \quad \text{Gl. 4.3}$$

- S_x : relative Empfindlichkeit des zu kalibrierenden Elementes x
 g : relative Emissionsrate des entsprechenden Peaks in der K, L, ...-Serie
 ω : Fluoreszenzausbeute für den betrachteten K, L, ...-Übergang
 f : Sprungfaktor für die maßgebliche Absorptionskante
 $(\tau/\rho)_{E_0}$: photoelektrischer Absorptionskoeffizient des Primärstrahls mit Photonenenergie E_0
 K : Konstante

Die Fundamentalparameter [g , ω , w , f , (τ/ρ)] können Tabellenwerken entnommen werden [72-74]. Die Konstante K wird unter Einbeziehung eines Referenzelementes bestimmt, dessen relative Empfindlichkeit $S_{\text{ref}} = 1$ gesetzt wird. Zusätzlich müssen in Gl. 4.3 noch der Detektorwirkungsgrad und die Transmission der Röntgenstrahlen in Luft berücksichtigt werden. Die aufgeführten Größen sind allein vom Nachweiselement abhängig und somit prinzipiell unabhängig von der Probenmatrix. Faktoren, die z.B. aus mineralischen oder organischen Matrices bestimmt wurden, weisen untereinander Abweichungen von $< 8 \%$ auf [46]. Diese Matrixunabhängigkeit der Kalibrierfaktoren sollte für das Element Schwefel überprüft werden. Dazu wurden drei anorganische Sulfate verwendet, die nach Verdampfen des Lösungsmittels unterschiedliche Eintrocknungsrückstände aufweisen. Darüber hinaus wurden die Bestimmungen mit vier unterschiedlichen Massenverhältnissen zwischen Schwefel und dem Referenzelement durchgeführt (Abb. 4.3).

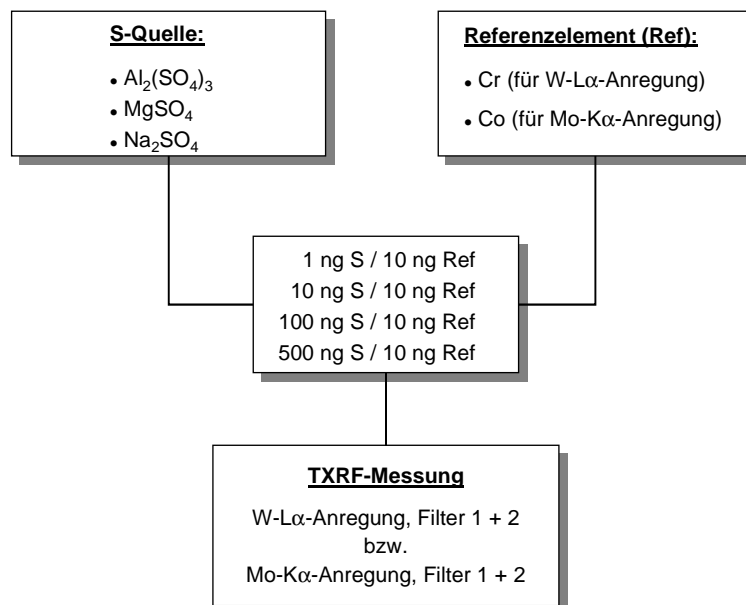


Abb. 4.3: Probenpräparation zur experimentellen Bestimmung der Matrixunabhängigkeit des relativen Empfindlichkeitsfaktors (Kalibrierfaktors) für das Element Schwefel für W-L α - und Mo-K α -Anregung.

Abb. 4.4 zeigt die doppellogarithmischen Darstellungen der relativen Empfindlichkeitsfaktoren aus den drei Sulfaten in Abhängigkeit des Schwefelgehaltes. Darin zeigen sich bei W-L α -Anregung bis zu einer absoluten Konzentration von 100 ng Schwefel für $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ und MgSO_4 gute Übereinstimmungen mit dem in der Geräte-Software vorinstallierten Faktor. Ab einem Gehalt von 100 ng wird ein geringerer Faktor bestimmt. Dieser Minderbefund ist für Na_2SO_4 besonders deutlich (Abweichungen bis zu 50 % zum vorhandenen Faktor). Im Mo-K α -Anregungsmodus zeigt sich ein ähnliches Bild. Gehalte von 1 ng Schwefel können hier allerdings nicht mehr detektiert werden. Bei Absolutmengen von 10 – 100 ng Schwefel ergibt sich für $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ und MgSO_4 aus den experimentellen Daten ein Faktor, der konstant 10 – 20 % über den vorhandenen liegt. Im Fall der Na_2SO_4 -Matrix zeigt sich dagegen wiederum eine kontinuierliche drastische Abnahme des experimentell bestimmten Faktors auf 50 % des vorhandenen Wertes.

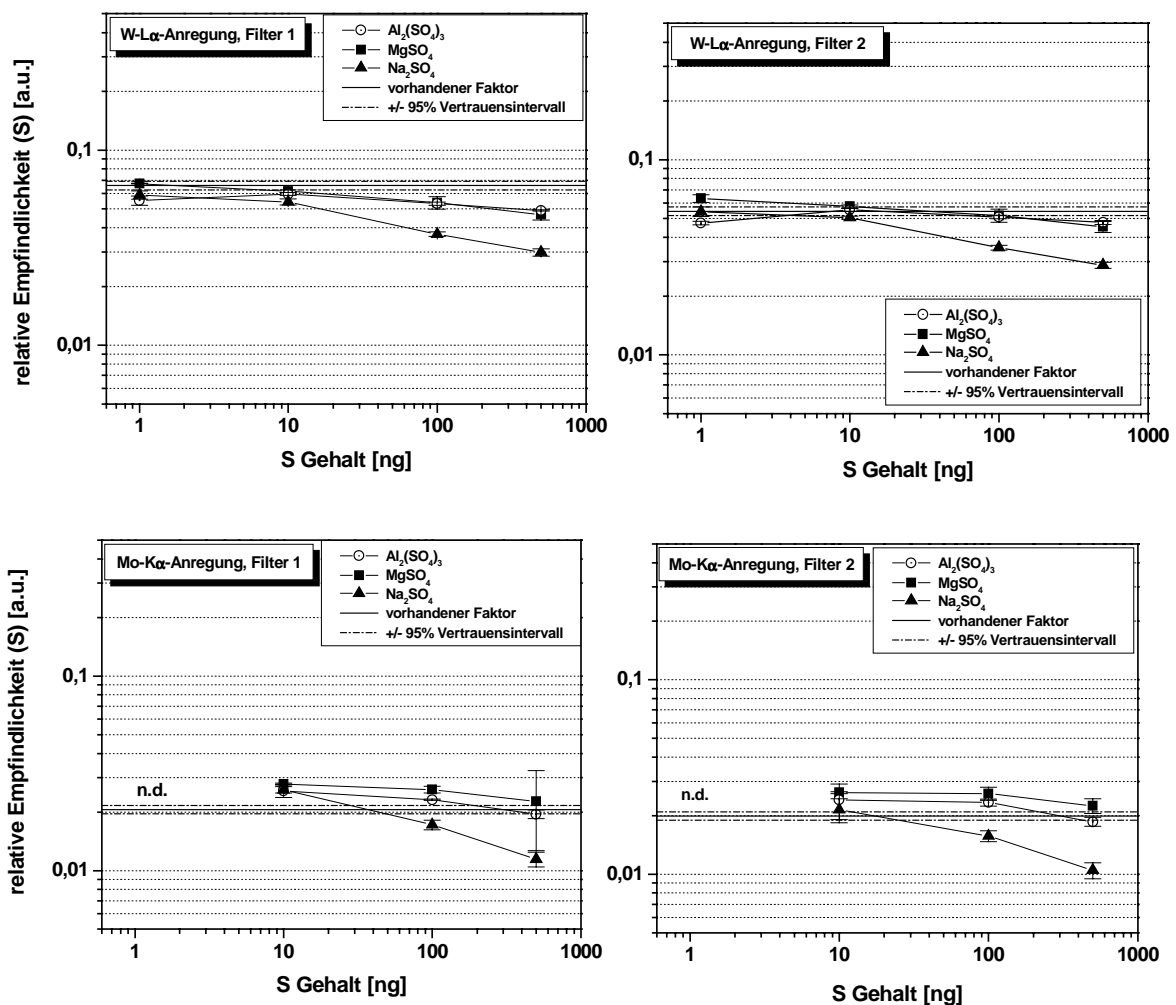


Abb. 4.4: Relative Empfindlichkeitsfaktoren (Kalibrierfaktoren) für Schwefel in Abhängigkeit von der eingesetzten Schwefel-Quelle und des -Gehaltes. Vergleich der hier experimentell bestimmten zu den in der Geräte-Software vorinstallierten Faktoren („vorhandener Faktor“) für den W-L α - und Mo-K α -Anregungsmodus (Filter 1 und 2). n.d. = nicht detektiert.

4.3 Diskussion

Exemplarisch sind für den W-L α -Anregungsmodus bei Verwendung des Filter 1 die Intensitätsverhältnisse von Schwefel zu dem Referenzelement Cr gegenüber dem Schwefelgehalt für die drei untersuchten Sulfate dargestellt (Abb. 4.5). Bis zu einer Absolutmenge von 10 ng ist die Beziehung zwischen Intensitätsverhältnis und Masse linear. Für höhere Schwefelmengen reduzieren Absorptionseffekte das Intensitätsverhältnis bzw. die Intensität des Schwefelsignals. Die gleichen Effekte zeigen sich auch mit Mo-K α -Anregungsstrahlung. Dadurch ergeben sich nach Gl. 4.3 die experimentell bestimmten Minderbefunde in den relativen Empfindlichkeitsfaktoren.

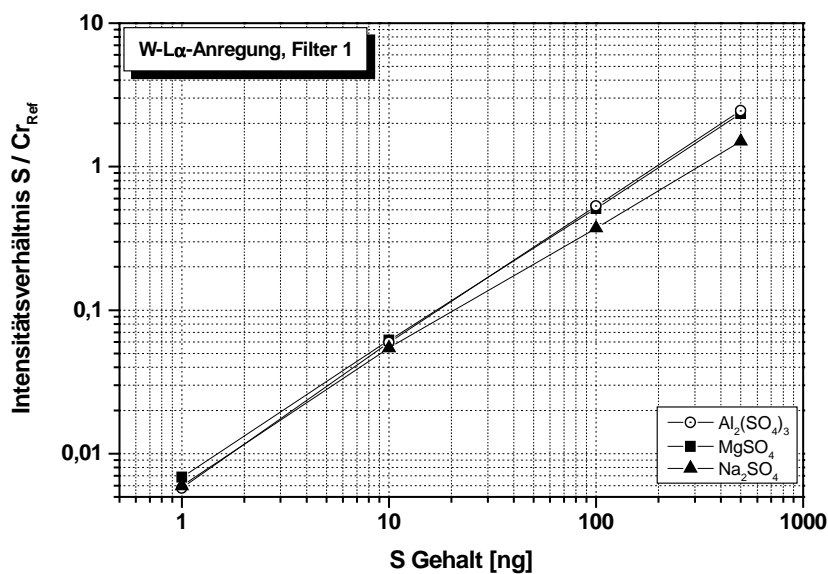


Abb. 4.5: Intensitätsverhältnis von Schwefel zu Referenzelement Chrom gegen den Schwefelgehalt in Abhängigkeit von der eingesetzten Schwefelquelle für W-L α -Anregung, Filter 1.

Die Schwächung der induzierten Fluoreszenzstrahlung des leichten Elementes Schwefel aufgrund von Interaktionen zwischen seiner Strahlung und Materie ist auf verschiedene Effekte zurückzuführen:

Der Massenschwächungskoeffizient (μ/p) ist abhängig von der Zusammensetzung (Elementzusammensetzung) der untersuchten Probe und der Energie der Röntgenphotonen. In Tab. 4.1 sind die Massenschwächungskoeffizienten von Schwefel für die drei Absorberelemente Na, Mg und Al in den drei Sulfaten dargestellt. Der Massenschwächungskoeffizient des Schwefels nimmt in der Reihenfolge Natrium \rightarrow Magnesium \rightarrow Aluminium zum Aluminium hin zu.

Absorber Strahler	Na	Mg	Al
S	1.036,716 cm ² /g	1.314,260 cm ² /g	1.634,751 cm ² /g

Tab. 4.1: Massenschwächungskoeffizienten von Schwefel für $K\alpha_{1,2}$ -Linien [75].

Unter weiterer Berücksichtigung der Metall zu Schwefel-Stöchiometrien⁽¹⁾ der drei Sulfate in den Massenschwächungskoeffizienten kommt es dagegen zu einer Umkehr der obigen Reihenfolge. Im Vergleich mit dem Absorber Aluminium beträgt der Massenschwächungskoeffizient von Schwefel im Absorber Natrium nun das Doppelte (Tab. 4.2).

Absorber Strahler	„Na ₂ SO ₄ “	„MgSO ₄ “	„Al ₂ (SO ₄) ₃ “
S	2.073,432 cm ² /g	1314,260 cm ² /g	1.089,834 cm ² /g
Metall:Schwefel	2:1	1:1	2:3

Tab. 4.2: Massenschwächungskoeffizienten von Schwefel unter Berücksichtigung der Metall:S-Stöchiometrien für $K\alpha_{1,2}$ -Linien [75].

Somit erfährt der Schwefel nach Tab. 4.2 in einer Na₂SO₄-Matrix mit einem Massenschwächungskoeffizienten von 2.073 cm²/g die höchste Absorption. Im Vergleich dazu liegen die Massenschwächungskoeffizienten für die beiden Referenzelemente Cr und Co in Abhängigkeit des Absorbers zwischen 50 und 100 cm²/g.

Im unteren Konzentrationsbereich (1 – 10 ng) scheint aber der Massenschwächungskoeffizient unabhängig vom verwendeten Sulfatstandard nur einen geringen Einfluss auf die Elementbestimmung von Schwefel zu nehmen. Die Absorption der induzierten Fluoreszenzstrahlung des Schwefels aufgrund von Schichtdickeneffekten spielt hier eine vorrangigere Rolle. Na₂SO₄ trocknet als sehr voluminöser Rückstand ein, in dessen Volumen vermutlich noch Reste von eingelagertem Wasser und/oder Luft eingebaut sind, was zur Bildung von Hohlräumen führen kann. Die Schichtdicken bewegen sich bei Schwefelgehalten von > 100 ng im Bereich > 30 µm. Dagegen zeigen die Rückstände von Al₂(SO₄)₃ und MgSO₄ im selben Konzentrationsbereich Schichtdicken von ≤ 5 µm (REM-Aufnahmen der Trocknungsrückstände von MgSO₄ siehe Anhang A). Theoretische Berechnungen der kritischen Schichtdicke d_{max} nach Gl. 2.5 (Kap. II), bei der noch eine maximal zulässige

¹ Es wurden allein die Metall zu Schwefel-Verhältnisse in den Sulfaten betrachtet. Sauerstoff und das Proben-trägermaterial Quarz wurden vernachlässigt.

Absorption für Schwefel von rund 5 % auftritt, ergeben für die drei verwendeten Sulfatstandards in Abhängigkeit der Anregungsstrahlung die in Tab. 4.3 zusammengestellten Werte.

Verbindung	Dichte [g/cm ³]	d _{max} (Mo-Kα) [μm]	d _{max} (W-Lα) [μm]
Al ₂ (SO ₄) ₃	2,71	5,6	1,5
Na ₂ SO ₄	2,68	5,7	1,5
MgSO ₄	2,66	5,7	1,5

Tab. 4.3: Kritische Schichtdicken d_{max} in Abhängigkeit von der Anregungsstrahlung.

Die Rückstände von Al₂(SO₄)₃ und MgSO₄ liegen unter bzw. im Bereich der kritischen Schichtdicke d_{max}. Die Rückstände des Na₂SO₄ dagegen liegen bei Schwefelgehalten von > 100 ng um etwa das sechsfache über der maximal zulässigen Schichtdicke. Ein weiteres Indiz für den vorrangigen Einfluss von Schichtdickeneffekten ist die Verbesserung der Schwefelbestimmung in anorganischen Sulfaten bei Verringerung der Rückstandshöhen durch den Zusatz von Filmbildnern [76].

Die relativen Empfindlichkeitsfaktoren tragen nur den unterschiedlichen Empfindlichkeiten der Emissionslinien der einzelnen Elemente Rechnung. Die bei den leichten Elementen wie Schwefel oder Phosphor auftretenden Absorptionseffekte durch hohe Matrixanteile und die dadurch möglichen Schichtdickeneffekte oder Überlagerungen von Absorptionskanten und Emissionslinien werden bzw. können nicht berücksichtigt werden. Auch durch die interne Standardisierung ist eine weitere Kompensation dieser Effekte nicht möglich.

KAPITEL V

Trocknungsmethoden

Bei der Durchführung von TXRF-Analysen ist es notwendig, dass das Lösungsmittel nach dem Aufbringen der Probe auf dem Probenträger entfernt wird. Zu diesem Zweck wird üblicherweise die Trocknung mittels einer Heizplatte oder unter einer IR-Lampe vorgenommen. Bei diesen auf Wärmeeinwirkung basierenden Trocknungsmethoden kommt es allerdings zur Zerstörung (Denaturierung) der Enzymmatrix. Dadurch besteht auf dem Probenträger die Gefahr von Entmischungseffekten zwischen den einzelnen Enzymbestandteilen bis hin zur Zerstörung bestimmter Strukturen: Proteingerüst, Eisen-Schwefel-Cluster, Häm-gebundenes Eisen, freie Metall-Ionen. Die damit möglicherweise verbundene Ausbildung von unterschiedlichen „Schichtlagen“ aus den einzelnen Enzymbestandteilen bis hin zur Gefahr von Elementverlusten können die Bestimmung der interessierenden Elemente beeinflussen. Aus diesem Grund sollte auch nach alternativen Trocknungsmethoden für die Analyse von Enzymproben mit der TXRF gesucht werden.

5.1 Probenpräparation

Die Untersuchungen wurden an den beiden Enzymen Cytochrom *c* Oxidase und NADH:Q Oxidoreductase (Komplex I) durchgeführt. Dazu wurden die Proben, dem allgemeinen Präparationsverfahren folgend (Kap. III), zuerst mit internem Standard versetzt und ein aliquoter Anteil von je 4 µl auf Quarzprobenträger aufgebracht. Die Proben wurden anschließend den folgenden vier Trocknungsmethoden zum Entfernen des Lösungsmittels unterworfen:

- Trocknung auf der Heizplatte bei 70 °C
- Lufttrocknung bei Raumtemperatur (RT)
- Vakuumtrocknung im Exsikkator bei 4 °C
- Gefriertrocknung bei –70 °C

Vor allem unter den beiden letztgenannten Bedingungen sollte die Enzymstruktur aufgrund der niedrigen Temperaturbereiche während des Trocknungsvorganges intakt bleiben. Definierte Trocknungszeiten wurden nicht eingehalten. Nach der Trocknung wurden die Proben mit TXRF bei Mo-K α -Anregung vermessen. Die Anregung mit W-L α -Strahlung

war durch das Auftreten hoher Totzeiten aufgrund der vorliegenden hohen Proteinkonzentrationen in den Proben nicht möglich.

5.2 Cytochrom *c* Oxidase

5.2.1 TXRF-Ergebnisse

Abb. 5.1 zeigt, dass die Bestimmung von Schwefel starken Schwankungen in Abhängigkeit von der verwendeten Trocknungsmethode unterworfen ist. Im Fall der Lufttrocknung bei Raumtemperatur werden gute Übereinstimmungen mit dem aus der biochemischen Proteinbestimmung⁽¹⁾ errechenbaren Schwefelgehalt erreicht. Den gravierendsten Minderbefund weist die Gefriertrocknung auf. Auf die Elementkonzentration der Cofaktoren Calcium, Eisen und Kupfer hat die verwendete Trocknungsmethode – auch die Gefriertrocknung – dagegen nur einen geringen bis keinen Einfluss. Bei Calcium und Eisen werden gute Übereinstimmungen mit den Erwartungswerten erzielt. Allein bei der Kupferbestimmung zeigten sich Minderbefunde von rund 8 %. Eine Erklärung für diese Beobachtung, die während der Anfertigung dieser Arbeit bei verschiedenen Messungen an der Cytochrom *c* Oxidase mehrfach auftrat, kann allerdings nicht gegeben werden. Kupfer, als das fluoreszenzintensivste der hier betrachteten Elemente, sollte wie das Eisen keinerlei Absorptionseffekten unterliegen.

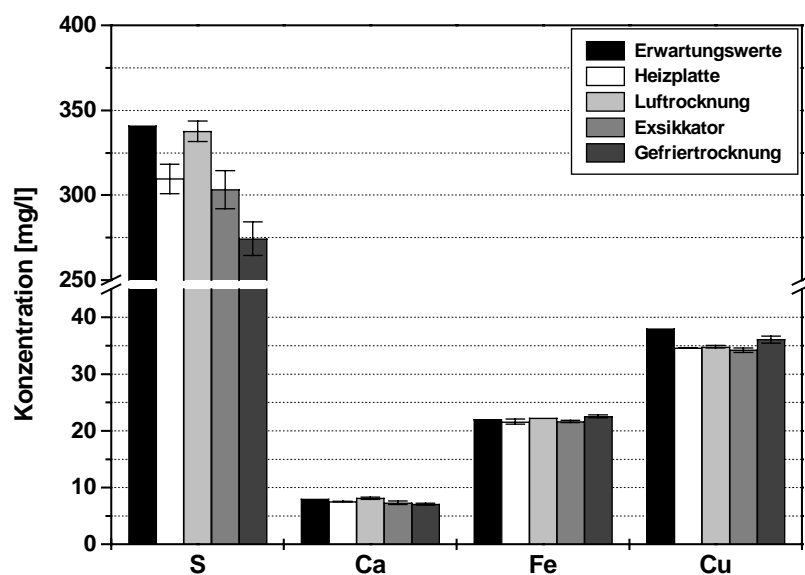


Abb. 5.1: Einfluss der Trocknungsmethode auf die Elementkonzentrationen der Cytochrom *c* Oxidase. Als Bezugswerte die nach der biochemischen Proteinbestimmung erwarteten Elementkonzentrationen („Erwartungswert“).

¹ Proteinkonzentration: ca. 25 mg/ml (197 µM)

	Erwartungswert	Heizplatte (70 °C)	Lufttrocknung (RT)	Exsikkator (4 °C)	Gefrier- trocknung (-70 °C)
Ca	1	1,1	1,0	1,0	1,1
Fe	2	2,2	2,0	2,2	2,6
Cu	3	3,0	2,8	3,1	3,6

Tab. 5.1: Einfluss der Trocknungsmethode auf die Elementstöchiometrien der Cofaktoren in der Cytochrom *c* Oxidase. Alle Angaben in mol/mol Enzym.

Die Auswirkungen der Trocknungsmethode auf die Schwefelbestimmung haben entsprechenden Einfluss auf die daraus berechneten Stöchiometrien der Cofaktoren (Tab. 5.1). Aufgrund der Minderbefunde von rund 10 % bei der Trocknung auf der Heizplatte und der Vakuumtrocknung im Exsikkator werden dort um 10 % zu hohe Calcium- und Eisen-Stöchiometrien im Vergleich zu den bekannten Elementstöchiometrien in der Cytochrom *c* Oxidase berechnet. Im Gegensatz dazu relativiert sich bei den beiden Trocknungsmethoden, aufgrund der gleichzeitig aufgetretenen Minderbefunde in der Kupferbestimmung, die berechnete Stöchiometrie für den Kupfer-Cofaktor. Die Abweichungen liegen hier bei maximal 3 %. Bei Betrachtung der berechneten Elementstöchiometrien bei der Gefrier-trocknung zeigen sich deutlich zu hohe Stöchiometrien von bis zu 30 %. Im Vergleich dazu spiegeln sich im Fall der Lufttrocknung die guten Wiederfindungen der TXRF-Analyse in den in Tab. 5.1 berechneten Werten wieder.

5.2.2 Topologische Untersuchungen

Die *ALPHA*-Step Höhenprofilaufnahmen und die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Eintrockenrückstände nach den angewendeten Trocknungsmethoden spiegeln deutlich die TXRF-Ergebnisse wider.

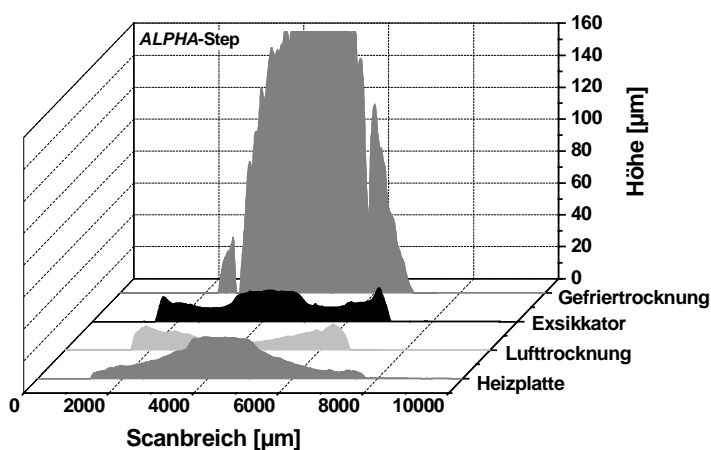


Abb. 5.2: *ALPHA*-Step Höhenprofilaufnahmen der Eintrockenrückstände von Cytochrom *c* Oxidase in Abhängigkeit von der verwendeten Trocknungsmethode

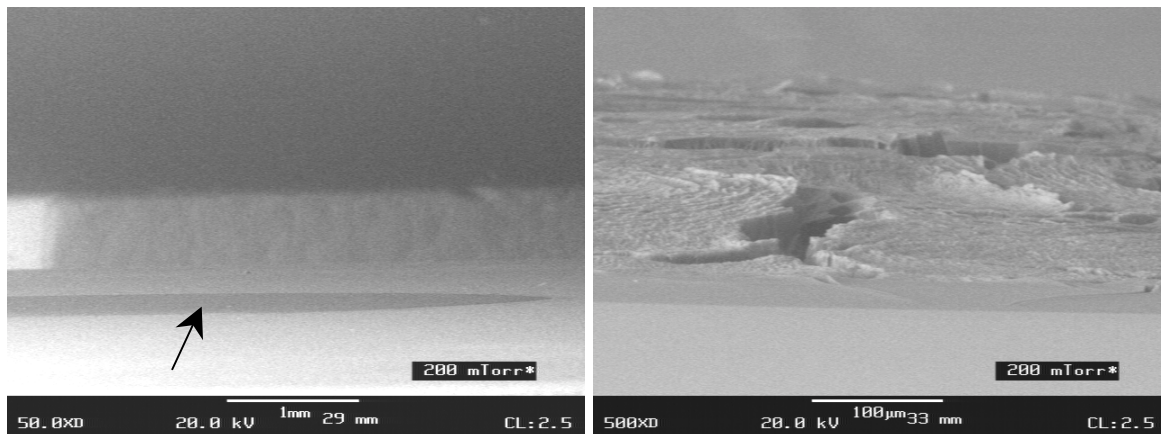


Abb. 5.3: REM-Aufnahmen (90° Kippwinkel der Probenhalterung) der Eintrockenrückstände erhalten nach der Lufttrocknung bei Raumtemperatur (links) und Gefriertrocknung (rechts).

Nach der Gefriertrocknung (Abb. 5.3. rechts) erhält man einen massiven Rückstand mit Schichtdicken $> 140 \mu\text{m}$. Die Rückstandsoberfläche ist aufgeplatzt, was aus der REM-Aufnahme (Seitenansicht) ersichtlich ist. Aufgrund dieses massiven Rückstandsprofils kommt es zu hohen Absorptionseffekten der emittierten Fluoreszenzstrahlung des Schwefels, die die starken Minderbefunde in der Schwefelbestimmung bedingen. Die beiden Metalle, aber auch das zu den leichteren Elementen zählende Calcium, zeigen trotz des massiven Rückstandes hier keinerlei Absorptionseffekte; die induzierte Fluoreszenzstrahlung ist ausreichend intensiv. Bei der Trocknung an Luft wird im Vergleich der Trocknungsmethoden ein gleichmäßiger Rückstand (Abb. 5.3 links) mit der geringsten Schichtdicke von $10 \mu\text{m}$ erhalten. Die dadurch minimierten Absorptionseffekte verbessern deutlich die Schwefelbestimmung. Die nach der Vakuumtrocknung im Exsikkator und bei Wärmezufuhr verbliebenen Rückstände liegen im Bereich von $15 - 25 \mu\text{m}$ (Abb. 5.2).

5.3 NADH:Q Oxidoreduktase (Komplex I)

5.3.1 TXRF-Ergebnisse

In Abb. 5.4 sind die mit TXRF erhaltenen Elementwiederfindungen im Vergleich zu den nach der biochemischen Proteinbestimmung zu erwartenden Elementgehalten dargestellt. Da im Fall des Komplex I noch keine gesicherten Daten in Bezug auf die Anzahl der schwefelhaltigen Aminosäuren und die Anzahl der Eisen-Schwefel-Cluster existieren, wurde der Erwartungswert mit einem Fehler versehen, der dem Stand der momentanen Diskussion entspricht. Die Trocknungsmethode mittels Gefriertrocknung fand hier aufgrund nicht genügend vorhandenem Enzymmaterials keine Anwendung.

Im Komplex I werden in Abb. 5.4 mit Ausnahme der über Wärmezufuhr (Heizplatte) eingetrockneten Enzymprobe gute Übereinstimmungen zwischen den beiden anderen Trocknungsverfahren festgestellt, sowohl für die Schwefelbestimmung als auch für die Bestimmung des Cofaktors Eisen. Die Lufttrocknung zeigt dabei im Vergleich mit dem Erwartungswert aus der biochemischen Proteinbestimmung⁽²⁾ die beste Übereinstimmung. Bei Trocknung unter Wärmezufuhr wird mittels TXRF eine deutlich zu hohe Schwefelkonzentration (~ 30 %) bestimmt.

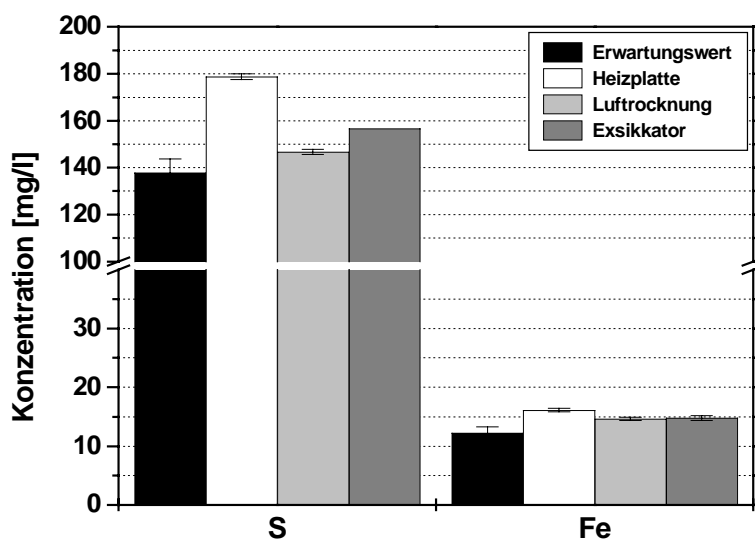


Abb. 5.4: Einfluss der Trocknungsmethode auf die Elementkonzentrationen des Komplex I. Als Bezugswerte die nach der biochemischen Proteinbestimmung erwarteten Elementkonzentrationen („Erwartungswert“).

In Tab. 5.2 enthält eine Zusammenfassung der Stöchiometrien des Cofaktors Eisen, die aufgrund der nach TXRF bestimmten Elementkonzentrationen berechnet wurden, in Bezug auf die verwendete Trocknungsmethode. Der erhaltene Unterschied von 6 % in der bestimmten Schwefelkonzentration nach der Vakuumtrocknung im Exsikkator und der Lufttrocknung bei Raumtemperatur bedingen eine Schwankungsbreite von ± 1 Eisen pro Komplex I.

	Erwartungswert	Heizplatte (70 °C)	Lufttrocknung (RT)	Exsikkator (4 °C)
Fe	22 ± 2	22,3	24,6	23,3

Tab. 5.2: Einfluss der Trocknungsmethode auf die Elementstöchiometrie des Cofaktors Eisen im Komplex I. Alle Angaben in mol/mol Enzym.

² Proteinkonzentration: 9,4 mg/ml (10 µM)

5.3.2 Topologische Untersuchungen

Abb. 5.5 und 5.6 zeigen die *ALPHA-Step* Höhenprofilaufnahmen und die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Trocknungsrückstände. Die Lufttrocknung weist ein etwas anderes Rückstandsprofil als die beiden anderen Trocknungsmethoden auf. Während die Probenrückstände nach Trocknung auf der Heizplatte und im Exsikkator ein relativ „gleichmäßiges“, aber rauhes Profil aufzeigen, kommt es bei der Lufttrocknung zu einer ausgeprägten Randbildung. Die ausgebildeten Schichtdicken sind vergleichbar. Sie liegen, in Abhängigkeit von der Trocknungsmethode, im Bereich von 8 – 14 μm . Die erhöhten Schwefelkonzentrationen bei der Trocknung unter Wärmezufuhr auf der Heizplatte können auch die topographischen Untersuchungen nicht erklären, da sich in diesem Fall die bei dieser Methode ermittelten Profile und Schichtdicken denen der Vakuumtrocknung im Exsikkator ähneln.

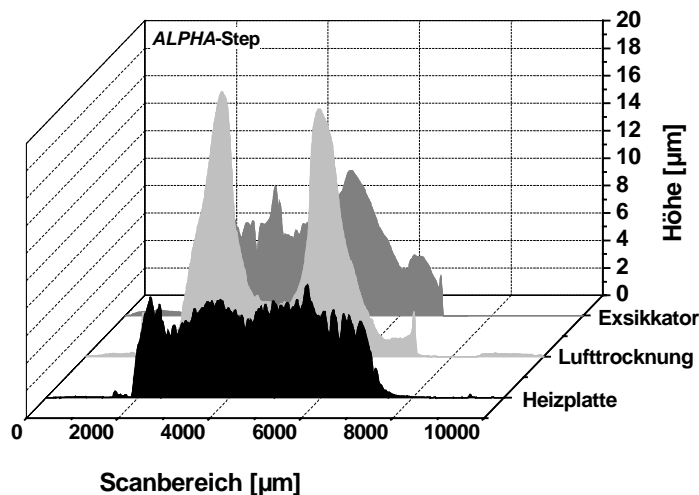


Abb. 5.5: *ALPHA-Step* Höhenprofilaufnahmen der Eintrockenrückstände von Komplex I in Abhängigkeit von der verwendeten Trocknungsmethode.

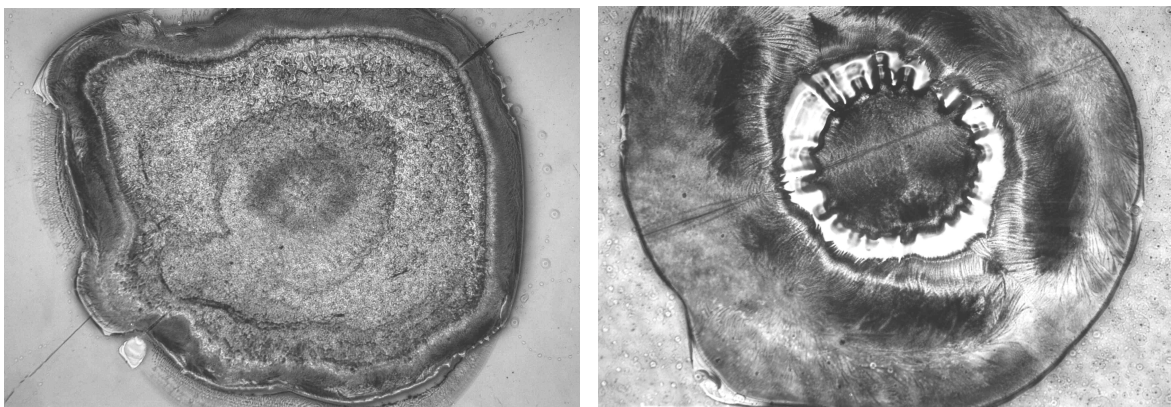


Abb. 5.6: REM-Aufnahmen der Eintrockenrückstände erhalten nach der Trocknung auf der Heizplatte (links) und Lufttrocknung bei Raumtemperatur (rechts).

ZUSAMMENFASSUNG

Der Vergleich zwischen den verschiedenen Trocknungsmethoden - Trocknung unter Wärmezufuhr auf einer Heizplatte (70 °C), an Luft bei Raumtemperatur, im Vakuum (4 °C) und mittels Gefriertrocknung (-70 °C) – zeigt einen Einfluss der Präparationsmethode auf die Bestimmung des leichten Elementes Schwefel. Dieser wird vorrangig durch die in Abhängigkeit von der beschriebenen Präparationsmethode erhaltenen Probenrückstände bestimmt. Überdurchschnittlich massive Rückstände (> 100 µm), wie sie nach der Gefriertrocknung der Cytochrom *c* Oxidase-Probe erhalten werden, bewirken eine starke Absorption der niederenergetischen Fluoreszenzstrahlung des Schwefels. Für die schwereren Elemente Calcium, Eisen und Kupfer sind dagegen Einflüsse der Trocknungsmethode und der ausgebildeten Rückstandsschichtdicken kaum erkennbar. Die induzierte Fluoreszenzstrahlung ist in allen Fällen ausreichend intensiv und hat eine genügend große Reichweite. Anhand der experimentellen Ergebnisse wurde die Trocknung an Luft bei Raumtemperatur zur Probenpräparation für die Analyse von Enzymproben ausgewählt. Diese Trocknungsmethode zeigte bei beiden Enzymen die besten Übereinstimmungen mit den aus den Proteinbestimmungen zu erwartenden Schwefelkonzentrationen.

KAPITEL VI

Evaluation der TXRF-Analysen von Enzymproben

Die Bestimmung des Proteingehaltes ist eine der Grundlagen der quantitativen Elementbestimmungen in Proteinen und Enzymen. Anhand des Proteingehaltes erfolgen die Berechnungen der auftretenden Stöchiometrien der Cofaktoren. Die Bestimmung des Proteingehaltes über die Bestimmung der Schwefelkonzentration in der zu untersuchenden Enzymprobe stellt eine Alternative zu den biochemischen Proteinbestimmungsmethoden dar. Da Schwefel allerdings an der unteren Grenze des bei konventionellen TXRF-Spektrometern gut bestimmbaren Elementbereiches liegt und desweiteren leicht der Gefahr von Absorptionseffekten unterliegt, musste zuerst die Präzision und Zuverlässigkeit der Schwefelbestimmung mittels TXRF untersucht werden. Anschließend erfolgten ebensolche Untersuchungen zur Bestimmung der Wiederfindung der unterschiedlichen Metall-Cofaktoren in den Enzymen.

6.1 Schwefel-Bestimmung

6.1.1 Probenpräparation

Zur Überprüfung der Wiederfindung des leichten Elementes Schwefel in den untersuchten Enzymmatrices von DFPase, Cytochrom *c* Oxidase und Komplex I wurden Standardadditionsversuche mit verschiedenen schwefelhaltigen Lösungen durchgeführt. Anhand dieser Versuche soll versucht werden, eine Aussage zu treffen, ab wann und bei welcher Stärke der Enzymmatrix Absorptionseffekte eine Rolle spielen, und wie zuverlässig der Schwefel mittels TXRF in Abhängigkeit von der Enzymmatrix bestimmt werden kann.

Als Aufstocklösungen für die Schwefeladditionsversuche wurden anorganische Schwefel-Standards (Sulfat-Standards) verwendet. Diese haben den Vorteil, dass das Gegenkation neben dem internen Standard als zweites Referenzelement und somit zur Kontrolle der verwendeten Aufstocklösungen dienen kann. Übergangsmetallsulfate sollten sich für diesen Zweck besonders gut eignen, da die Übergangsmetalle aufgrund ihrer höheren Fluoreszenzausbeuten, im Gegensatz zum Schwefel, weniger der Gefahr von Absorptionseffekten unterliegen. Allerdings erwiesen sich Aufstocklösungen aus NiSO_4 oder Rb_2SO_4 als ungeeignet, da eine zu hohe Konzentration an dem fluoreszenzstarken Gegenkation die

Bestimmung der leichten Elemente stark beeinflusst (siehe auch [76]). Als gut geeignet erwies sich eine 1:1 Mischung aus MgSO_4 und NiSO_4 , in der bei gewünschter Schwefelkonzentration die Konzentration an dem Gegenkation Nickel um die Hälfte reduziert werden kann. Magnesium ist nicht mit dem verwendeten TXRF-Spektrometer detektierbar.

Abb. 6.1 zeigt den Ablauf der Probenpräparation und die verwendeten Schwefelaufstocklösungen. Für die untersuchten Enzyme wurden aufgrund der unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen von Schwefel und der vorliegenden Probenmengen unterschiedliche Präparationen vorgenommen. Alle Proben wurden anschließend mit TXRF unter $W\text{-L}\alpha$ - und $Mo\text{-K}\alpha$ -Anregung analysiert.

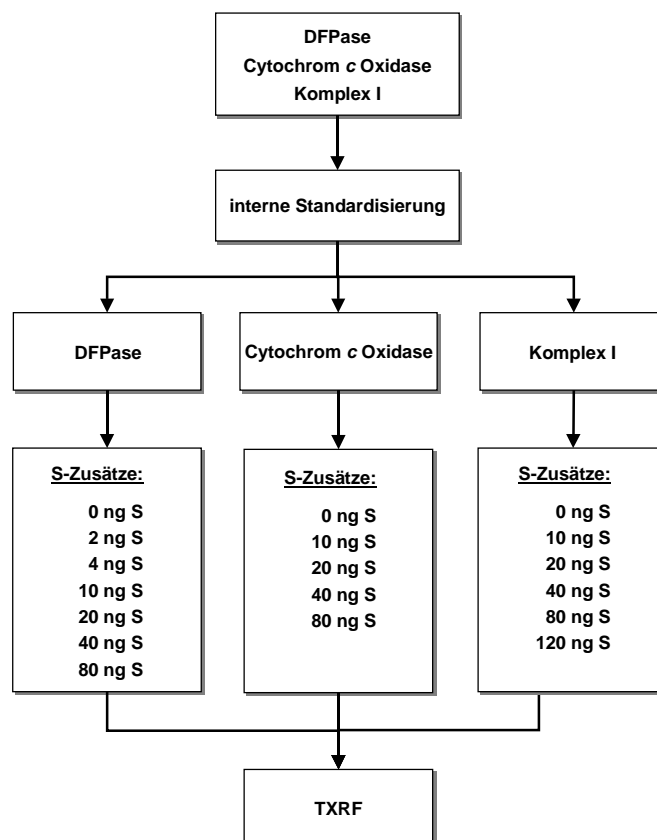


Abb. 6.1: Probenpräparation zu Schwefeladditionsversuchen. Die Schwefelaufstocklösungen wurden jeweils durch Verdünnungen aus 1:1-Mischungen von 1.000 mg/l MgSO_4 und 1.000 mg/l NiSO_4 (jeweils bezogen auf S) Stammlösungen hergestellt. Interne Standards: DFPase 2 mg/l Cr; Cytochrom c Oxidase 5 mg/l Cr; Komplex I 10 mg/l Mn.

Der durch die jeweilige Proteinkonzentration vorgegebene Grundgehalt an Schwefel (Anzahl der schwefelhaltigen Aminosäuren sowie – wie im Fall des Komplex I - eventuell zusätzliche Schwefelquellen durch vorhandene Fe-S-Cluster) wurde zuerst mittels einer TXRF-Messung bestimmt. Ausgehend von diesem so bestimmten Grundgehalt wurden die

nach den einzelnen Schwefelzusätzen erwarteten Schwefelgehalte berechnet. Anschließend wurden die Enzymproben mit den entsprechenden Aufstocklösungen versetzt und mit TXRF vermessen. Zur näheren Interpretation der Ergebnisse wurden zusätzlich REM- und ALPHA-Step-Aufnahmen von den Trocknungsrückständen aufgenommen.

6.1.2 Diisopropylfluorophosphatase (DFPase)

Die DFPase ist mit einem Molekulargewicht von 35.079 Da und 16 schwefelhaltigen Aminosäuren das kleinste der drei betrachteten Enzyme. Ausgehend von dem mittels TXRF bestimmten Grundgehaltes⁽¹⁾ an Schwefel wurden die nach den einzelnen Schwefelzusätzen erwarteten Schwefelgehalte berechnet und in Abb. 6.2 gegen die experimentell bestimmten Schwefelgehalte aufgetragen. Die Abweichung gegenüber der Winkelhalbierenden ergibt die Schwefelwiederfindung [%]. Da für die beiden Anregungsmodi W-L α und Mo-K α Unterschiede von 1 mg/l (4 ng) im bestimmten Schwefelgehalt festgestellt wurden, erfolgte die Berechnung und Bestimmung der erwarteten Schwefelgehalte jeweils getrennt für jede Anregungsart.

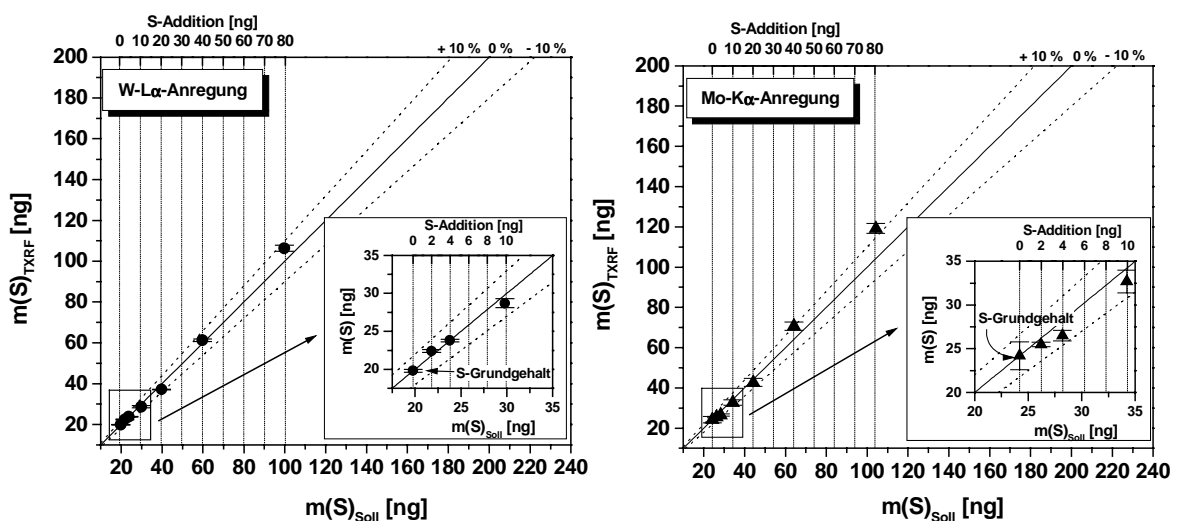


Abb. 6.2: Schwefel Wiederfindungen in der DFPase nach Addition definierter Schwefelgehalte mit $MgSO_4/NiSO_4$ (1:1); links: W-L α -Anregung, rechts Mo-K α -Anregung.

Abb. 6.2 zeigt für den betrachteten Konzentrationsbereich sehr gute Wiederfindungsraten für Schwefel innerhalb eines Toleranzbereiches von kleiner ± 10 %. Die Abweichungen zu den Erwartungswerten liegen durchschnittlich bei ± 4 %. Die Fehlerschwankungen bei den einzelnen Additionsschritten sind sehr gering. Die relativen Standardabweichungen bewegen sich hierbei um 1 – 2 %. Das Ausführen einer linearen Regression ergibt für die beiden mit TXRF erhaltenen Additionsreihen jeweils einen R-Wert von 0,9986. In Tab. 6.1

¹ Proteinkonzentration: 0,456 mg/ml (13 μ M)

sind die Wiederfindungsraten für das in den einzelnen Aufstocklösungen enthaltene Gegenkation Nickel zusammengestellt. Es zeigen sich auch hier sehr gute Wiederfindungen, die im Durchschnitt Abweichungen von besser $\pm 5 \%$ zu den erwarteten Nickel-Gehalten aufweisen.

Addition	erwarteter Ni-Gehalt [ng]	bestimmter Ni-Gehalt [ng]	Ni-Wiederfindung [%]
Grundgehalt	--	--	--
1. Add. (2 ng S)	1,8	1,7	94
2. Add. (4 ng S)	3,7	3,8	103
3. Add. (10 ng S)	9,2	8,2	90
4. Add. (20 ng S)	18,3	17,5	96
5. Add. (40 ng S)	36,6	37,2	101
6. Add. (80 ng S)	73,2	75,3	103

Tab. 6.1: Wiederfindungen des in den Aufstocklösungen ($\text{MgSO}_4/\text{NiSO}_4$ 1:1) enthaltenen Gegenkations Nickel für die einzelnen Schwefel-Additionen zu DFPase (Mo-K α -Anregung); die Auswertung erfolgte über den internen Standard Chrom.

Die Charakterisierung der Trocknungsrückstände mittels REM (siehe Anhang A) und *ALPHA*-Step zeigen dünne, „raue“ Schichten mit Schichtdicken von $< 0,2 \mu\text{m}$. Abb. 6.3 zeigt die aufgenommenen *ALPHA*-Step Oberflächenprofilaufnahmen.

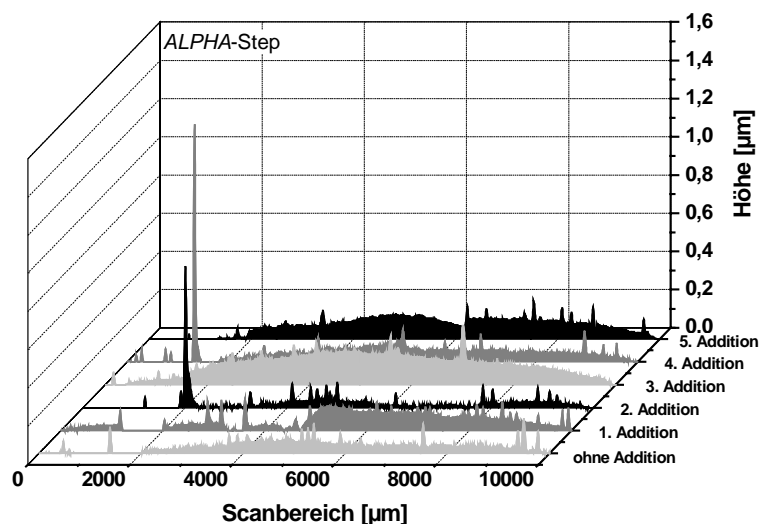


Abb. 6.3: *ALPHA*-Step Höhenprofilaufnahmen der Trocknungsrückstände von DFPase vor und nach der Zugabe der verschiedenen Schwefel-Aufstocklösungen.

Ausgehend von einem Schwefel-Grundgehalt von 20 ng (5 mg/l) der vorliegenden DFPase-Probe kann der Schwefel und damit der Proteingehalt mit beiden Anregungsmodi auf etwa 2 ng (0,25 – 0,5 mg/l) genau bestimmt werden. Dies bedeutet für die nachfol-

gende Kalkulation der Stöchiometrien der beiden Calcium Cofaktoren eine Fehlerschwankung von $\pm 0,2$ Ca pro DFPase. Auch höhere Schwefelkonzentrationen sind ohne Probleme bestimmbar. Die Zuverlässigkeit der Schwefelbestimmung begründet sich im geringen Matrixanteil der DFPase Proben: kleines Molekulargewicht ($M_r = 35.079$ Da), geringe Pufferkonzentrationen (2 mM Tris/Acetat), kein Detergentienzusatz. Durch die damit verbundene Ausbildung von dünnen Schichten während der Probenpräparation werden Absorptionseffekte praktisch ausgeschlossen.

6.1.3 Cytochrom *c* Oxidase

Die Cytochrom *c* Oxidase ist bezüglich ihres Molekulargewichtes von 126.330 Da und ihren 54 schwefelhaltigen Aminosäuren das mittlere der drei hier betrachteten Enzyme. Auch bei ihr erfolgte, analog zur DFPase, zuerst die Bestimmung des Grundgehaltes an Schwefel⁽²⁾ mittels TXRF. Die gemäß den Additionszusätzen berechneten Schwefelgehalte wurden in Abb. 6.4 den experimentell bestimmten Gehalten gegenübergestellt.

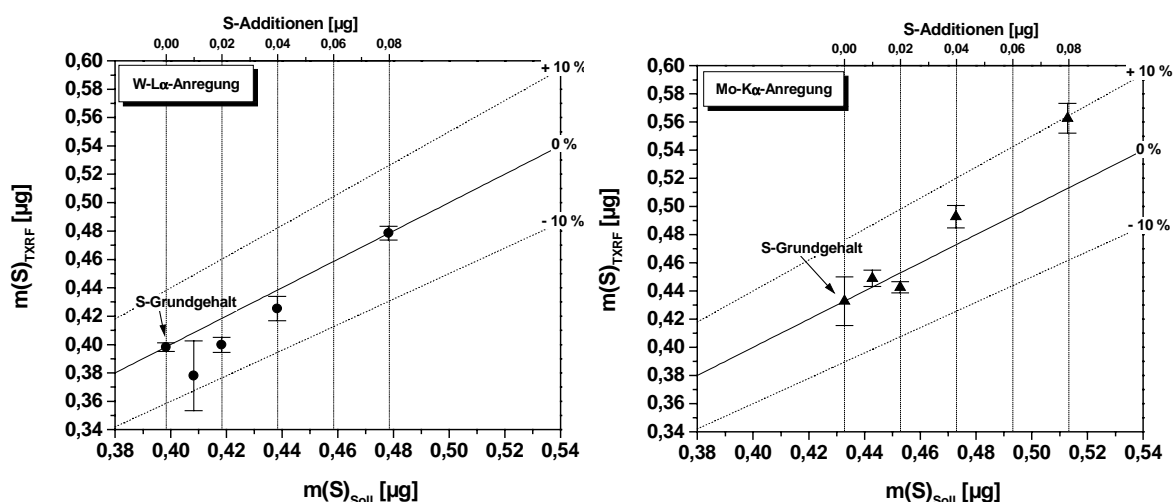


Abb. 6.4: Schwefel-Wiederfindungen in der Cytochrom *c* Oxidase nach Addition definierter Schwefelgehalte mit $\text{MgSO}_4/\text{NiSO}_4$ (1:1); links: W-L α -Anregung, rechts Mo-K α -Anregung.

Wie aus Abb. 6.4 zu erkennen, erhält man für den W-L α - und Mo-K α -Anregungsmodus über den gesamten Konzentrationsbereich gute Wiederfindungen für Schwefel. Die relativen Standardabweichungen bewegen sich durchschnittlich im Bereich von 2 %. Im Gegensatz zur DFPase werden zwischen den beiden Anregungsmodi W-L α und Mo-K α bei Mo-K α um etwa 0,03 μg (9 mg/l) höhere Schwefelgehalte detektiert. Die Ausführung einer linearen Regression für den jeweils angewendeten Anregungsmodus ergibt einen R-Wert von 0,9529 im Fall der W-L α -Anregung und einen R-Wert von 0,9835 für die unter Mo-K α -Anregung erhaltene Additionsreihe. Die Wiederfindungen für das in den einzelnen

² Proteinkonzentration: 10 mg/ml (79 μM)

Aufstocklösungen enthaltene Gegenkation Nickel (Tab. 6.2) liegen im Durchschnitt leicht über einem Toleranzbereich von 10 %. Diese schlechteren Wiederfindungsraten im Vergleich zur DFPase und zum Komplex I (vergl. Kap. 6.1.4) können eventuell mit der Überlagerung („Interferenzen“) der $K\alpha$ - und $K\beta$ -Peaks von Nickel und dem Cofaktoren-Element Kupfer erklärt werden (Ni- $K\beta$: 8,27 keV, Cu- $K\alpha$: 8,04 keV). In der DFPase und im Komplex I kommt Kupfer als Cofaktor nicht vor.

Addition	erwarteter Ni-Gehalt [ng]	bestimmter Ni-Gehalt [ng]	Ni-Wiederfindung [%]
Grundgehalt	--	--	--
1. Add. (0,01 $\mu\text{g S}$)	9,2	10,4	113
2. Add. (0,02 $\mu\text{g S}$)	18,4	19,2	104
3. Add. (0,04 $\mu\text{g S}$)	37,2	41,0	110
4. Add. (0,08 $\mu\text{g S}$)	73,2	85,2	116

Tab. 6.2: Wiederfindungen des in den Aufstocklösungen ($\text{MgSO}_4/\text{NiSO}_4$ 1:1) enthaltenen Gegenkations Nickel für die einzelnen Schwefel-Additionen zu Cytochrom *c* Oxidase (Mo- $K\alpha$ -Anregung); die Auswertung erfolgte über den internen Standard Chrom.

Bei Betrachtung der Probenrückstände von Cytochrom *c* Oxidase ohne und mit Zusatz der verschiedenen Schwefel-Aufstocklösungen zeigen sich im Gegensatz zur DFPase deutlich ausgeprägtere Rückstände mit Schichtdicken von $\leq 5 \mu\text{m}$ (Abb. 6.5).

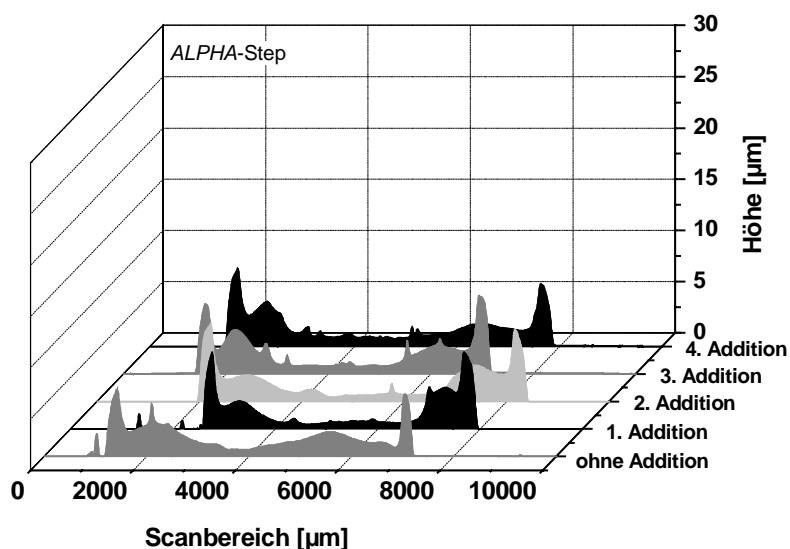


Abb. 6.5: ALPHA-Step Höhenprofilaufnahmen der Trocknungsrückstände von Cytochrom *c* Oxidase vor und nach der Zugabe der verschiedenen Schwefel-Aufstocklösungen.

Das Element Schwefel kann in diesem Enzym bei einem Grundgehalt von 0,4 μg (100 mg/l) S nach der durchgeführten Konzentrationsreihe auf mindestens 0,01 – 0,02 μg

(2,5 – 5 mg/l) S genau bestimmt werden. Diese Fehlerbreite von 5 % bewirkt in den, auf Grundlage dieser Schwefelkonzentration berechneten, Elementstöchiometrien Unsicherheiten von $\pm 0,1$ Metallzentren pro Cytochrom *c* Oxidase. Selbst bei einer Fehlerbreite von 10 % würde dies hier nur eine Unsicherheit von $\pm 0,1$ Metallzentren pro Cytochrom *c* Oxidase bedeuten. Aufgrund der leicht besseren linearen Beziehung und aufgrund der vorliegenden höheren Schwefelkonzentrationen würde allerdings eine Bevorzugung auf Seiten der Anregung mit Mo-K α -Röntgenstrahlung liegen.

6.1.4 NADH: Q Oxidoreduktase (Komplex I)

Der Komplex I ist das größte der hier betrachteten Enzyme (Molekulargewicht etwa 944.000 Da). Aus der Aminosäuresequenz und Fe-S-Clustern besitzt er einen Grundgehalt von etwa 450 Schwefelatomen in seiner Struktur. Die Konzentration des Schwefels aufgrund des Proteingehaltes in der vorliegenden Probe wurde wie bei den beiden zuvor betrachteten Enzymen mit den beiden verwendeten Anregungsmodi festgestellt⁽³⁾. Im Fall des Komplex I zeigen sich bei der Schwefel Wiederfindung nach Zusatz der einzelnen schwefelhaltigen Additionslösungen starke Abweichungen zu den berechneten Gehalten (Abb. 6.6). Ab dem 2. Additionsschritt von 0,02 μg S werden mit beiden Anregungsmodi Schwefel Wiederfindungen von nur 68 – 89 % beobachtet. Die starken Absorptionseffekte spiegeln sich auch in den hohen relativen Standardabweichungen wieder, die bis zu 21 % betragen. Insgesamt zeigt sich im Vergleich der beiden Anregungsmodi eine leicht bessere Wiederfindung im W-L α -Anregungsmodus. Auf die Ausführung einer linearen Regression wurde in diesem Fall verzichtet, da die Korrelation der Additionsreihen zu schlecht ist.

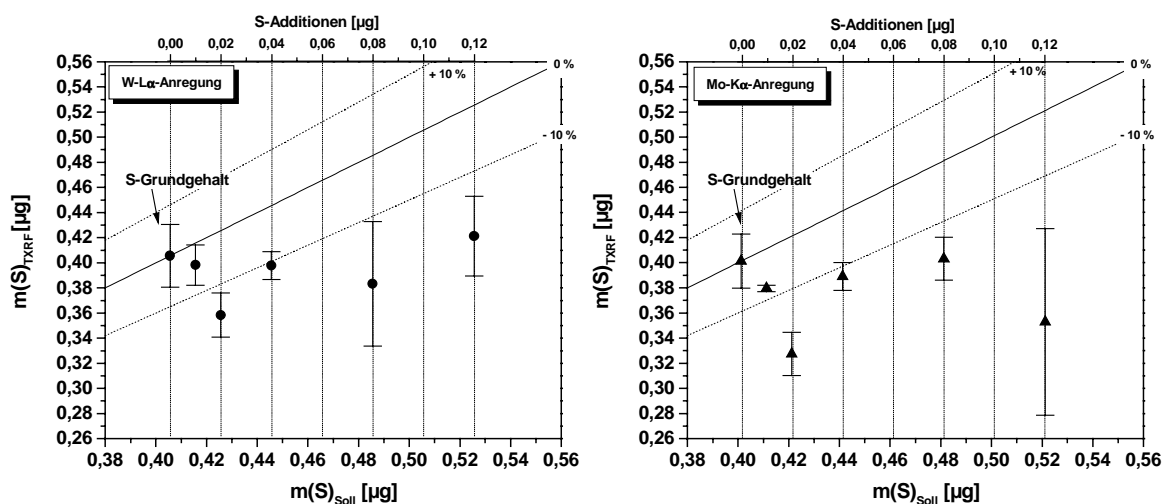


Abb. 6.6: Schwefel Wiederfindungen im Komplex I nach Addition definierter Schwefelgehalte mit $\text{MgSO}_4/\text{NiSO}_4$ (1:1); links: W-L α -Anregung, rechts: Mo-K α -Anregung.

³ Proteinkonzentration: 7,4 mg/ml (7,8 μM)

Die Wiederfindungen des Gegenkations Ni (Tab. 6.3) sind mit Abweichungen von maximal 6 % von den Erwartungswerten besser als bei der Cytochrom *c* Oxidase und machen somit deutlich, dass die geringen Wiederfindungsraten vermutlich allein durch Absorptionseffekte der Fluoreszenzstrahlung des Schwefels bedingt sind.

Addition	erwarteter Ni-Gehalt [ng]	bestimmter Ni-Gehalt [ng]	Ni-Wiederfindung [%]
Grundgehalt	--	--	--
1. Add. (0,01 µg S)	9,2	9,6	104
2. Add. (0,02 µg S)	18,4	17,4	95
3. Add. (0,04 µg S)	36,0	34,6	96
4. Add. (0,08 µg S)	74,0	68,8	93
5. Add. (0,12 µg S)	110,0	97,8	90

Tab. 6.3: Wiederfindungen des in den Aufstocklösungen (MgSO₄/NiSO₄ 1:1) enthaltenen Gegenkations Ni für die einzelnen Schwefel-Additionen zu Komplex I (Mo-K α -Anregung); die Auswertung erfolgte über den internen Standard Mangan.

Im Gegensatz zur DFPase und zur Cytochrom *c* Oxidase enthält der Komplex I säurelabile Eisen-Schwefel-Zentren (Kap. 3.1.3). Im Zuge der Probenpräparation, insbesondere beim Versetzen der Enzymprobe mit den sauren Standardlösungen, sind mögliche Verluste dieser Schwefelanteile durch Bildung flüchtigem Schwefelwasserstoffs denkbar. pH-Wert Bestimmungen des verwendeten Puffersystems vor und nach Zugabe eines internen Standards sollen eine ausreichende Pufferkapazität aufzeigen. Dazu wurde ein 100 mg/l Yttrium-Standard aus einer kommerziell erhältliche AAS-Standardlösung⁽⁴⁾ in unterschiedlichen Verdünnungsmedien (DI-H₂O, 0,2% HNO₃ bzw. halbkonzentrierter HNO₃) angesetzt. Aliquote Anteile Komplex I wurden anschließend der allgemeinen Probenpräparation folgend mit den angesetzten Standardlösungen versetzt. Abb. 6.7 zeigt die Ergebnisse der pH-Wert- und TXRF-Messungen. Nach den erhaltenen Ergebnissen der pH-Wert Messungen sollte bei Präparation der Komplex I Proben mit internen Standards, die vorher mit DI-H₂O auf die benötigte Konzentration verdünnt wurden, kein Verlust des säurelabilen Schwefels beobachtet werden, da die Pufferkapazität ausreichend ist. Der pH-Wert liegt hier nach Zugabe des Standards zwischen 6,5 – 7. Aus den TXRF Ergebnissen ist beim Vergleich der unterschiedlichen Verdünnungsmedien ebenfalls kein signifikanter Verlust an Schwefel zu beobachten.

⁴ Yttrium Atomabsorptionsstandardlösung 1000 mg/l (Yttrium(III)nitrat in Salpetersäure; 0,5 mol/l HNO₃)

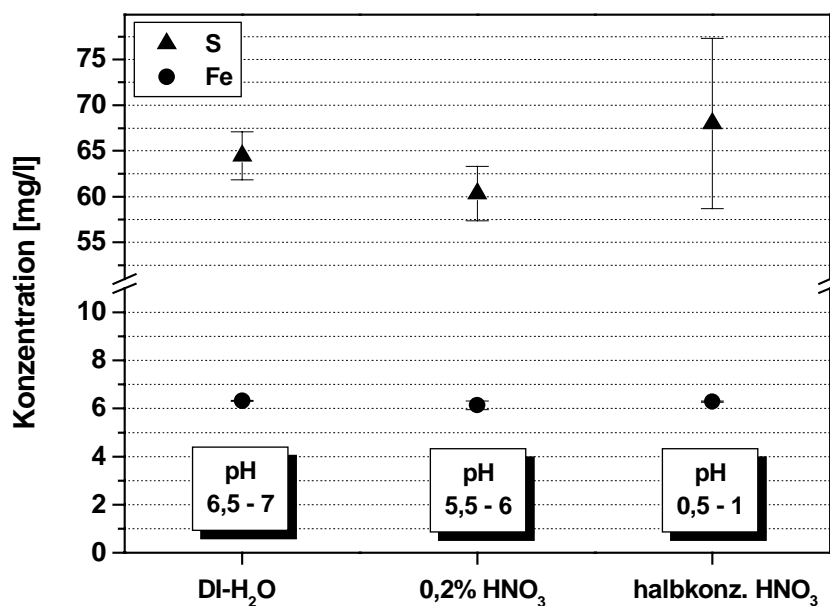


Abb. 6.7: Schwefel- und Eisenkonzentrationen im Komplex I nach Zusatz von internen Standards, angesetzt in unterschiedlich sauren Medien (DI-H₂O, 0,2% HNO₃, halbkonzentrierter HNO₃). Puffersystem des Komplex I: 50 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, 0,1% Dodecylmaltosid, pH 7,4. Ebenfalls angegeben die Veränderung des pH-Wertes im Komplex I nach Zusatz der unterschiedlich angesetzten internen Standards. Anregungsstrahlung: Mo-K α .

Die Differenzen in der Schwefeldetektion zwischen „DI-H₂O“ und „0,2% HNO₃“ liegen innerhalb der Standardabweichungen. Bei der Präparation der Komplex I Probe mit einem Standard, der in halbkonzentrierter HNO₃ angesetzt wurde, wird ein etwas höherer Schwefelgehalt mit TXRF bestimmt. Außerdem wurde bei Standardzugabe ein deutlicher Geruch von Schwefelwasserstoff wahrgenommen und eine Denaturierung des Enzyms festgestellt. Letzteres erklärt auch die deutlich höhere Standardabweichung für Schwefel bei der TXRF-Messung aufgrund der nun erhöhten Rauigkeit des Probenrückstandes. Rein rechnerisch würde sich der Verlust der 20 säurelabilen Schwefel mit einer Differenz von 2,5 mg/l (0,01 μ g) Schwefel im Gehalt der Probe bemerkbar machen.

Somit sind in Abb. 6.6 die deutlichen Minderbefunde der durchgeführten Konzentrationsreihe nicht auf einen Verlust der Schwefel aus den Fe-S-Zentren zurückzuführen, sondern wie bereits vermutet durch Absorptionseffekte bedingt sein. In Abb. 6.8 sind die ALPHA-Step Höhenprofile der Trocknungsrückstände dargestellt. Die Aufnahmen zeigen im Vergleich zu dem Profil der Rückstände der Cytochrom *c* Oxidase massivere Trocknungsrückstände. Vor allem nach dem letzten Additionsschritt („5. Addition“) ist ein zusammengeballter, ausgeprägter Rückstand zurückgeblieben mit einer Schichtdicke von 30 μ m, der für die deutlichen Absorptionseffekte und die daraus resultierenden Minderbefunde ver-

antwortlich ist. Bei allen anderen Trocknungsrückständen ist eine ausgeprägte Randbildung der ansonsten rotationssymmetrischen Rückstände zu beobachten.

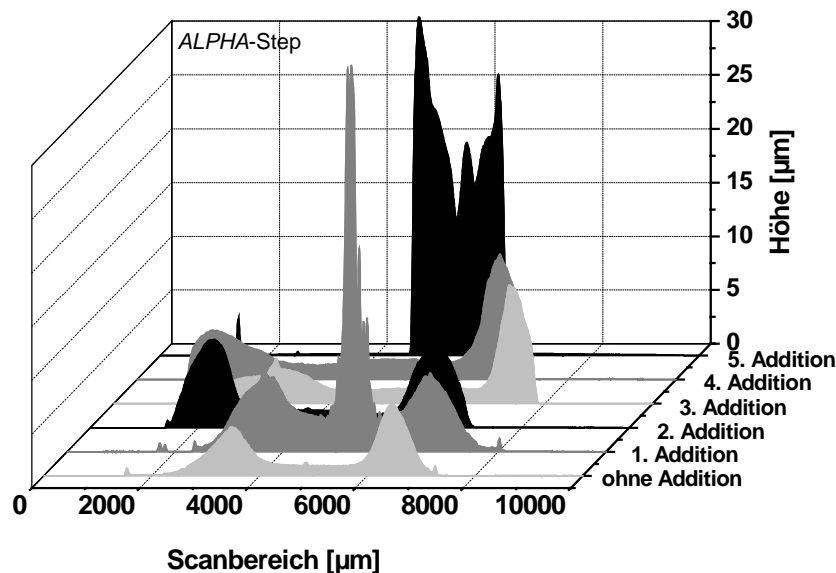


Abb. 6.8: ALPHA-Step Höhenprofilaufnahmen der Trocknungsrückstände von Komplex I vor und nach der Zugabe der verschiedenen Schwefel-Aufstocklösungen.

Eine gesicherte Schwefelbestimmung ist aufgrund des vorliegenden hohen Matrixanteils im Komplex I nicht zu erhalten. Ausgehend von dem bei dieser Probe vorliegenden Grundgehalt von $0,4 \mu\text{g}$ (100 mg/l) S kann der Schwefel dabei auf minimal $\pm 10 \%$ genau bestimmt werden. Im weiteren Verlauf der durchgeführten Konzentrationsreihe bedingt der zugesetzte anorganischen Sulfat-Standard eine stetige Erhöhung der Matrix. Dadurch kommt es ab dem zweiten Additionsschritt zu der erhöhten Absorption der niederenergetischen Schwefel-Fluoreszenzstrahlung. Die Fehlerbreite von $\pm 10 \%$ in der Schwefel-Bestimmung bedeutet allerdings eine Unsicherheit in der anschließend berechneten Cofaktoren Stöchiometrie von $\pm 2 - 3$ Eisen pro Komplex I. Diese Unsicherheit ist insoweit inakzeptabel, als dass es im Fall des Komplex I darauf ankommt, eventuell einen weiteren, bis dahin unbekanntem binuklearen Fe-S-Cluster zu identifizieren. Eine deutliche Verbesserung in der Schwefelbestimmung könnte sehr wahrscheinlich durch eine Reduktion der gebildeten Probenrückstände in Abb. 6.8 erfolgen.

6.2 Cofaktoren Bestimmung

In den vorangegangenen Abschnitten dieses Kapitels wurden zur Überprüfung der Genauigkeit bei der Schwefel-Wiederfindung Konzentrationsreihen mit schwefelhaltigen Standards an unterschiedlichen Enzymmatrices vorgenommen. Im Folgenden soll nun

gezeigt werden, in wieweit sich die Enzymmatrices auch auf die Genauigkeit bei der Cofaktorenbestimmung auswirken.

Dazu wurden mit dem Enzym DFPase, welches zwei Calcium-Ionen als Cofaktoren in seiner Struktur aufweist, eine Konzentrationsreihe mit Calcium durchgeführt. Der Grundgehalt an Calcium wurde zuerst mittels TXRF bestimmt. Ausgehend von diesem so bestimmten Grundgehalt wurden die nach den einzelnen Calciumzusätzen erwarteten Calciumgehalte berechnet. Die Cytochrom *c* Oxidase enthält dagegen drei verschiedene Cofaktoren in ihrer Struktur: ein Calcium-, zwei Eisen- und drei Kupfer-Ionen. Bei während der Anfertigung dieser Arbeit bearbeiteten Projekten zur Cytochrom *c* Oxidase und ihrer Mutanten zeigte sich in den TXRF-Analysen, entgegen den Erwartungswerten, teilweise ein zu niedriger Kupfer-Gehalt (20 %). Aus diesem Grund wurde hier eine Konzentrationsreihe mit Kupfer durchgeführt. Auch bei der Cytochrom *c* Oxidase wurde zuerst eine Grundgehaltsbestimmung an Cu mittels TXRF vorgenommen und anschließend die nach der Konzentrationsreihe zu erwartenden Cu-Gehalte berechnet. Zusätzlich wurde zum Vergleich noch eine Konzentrationsreihe an einem Enzym (Cytochrom *bc₁*-Komplex⁽⁵⁾) vorgenommen, welches ein zur Cytochrom *c* Oxidase vergleichbares Molekulargewicht aufweist, aber kein Kupfer als Cofaktor in seiner Struktur besitzt. Eine Konzentrationsreihe mit Eisen am Komplex I konnte mangels zur Verfügung stehenden Probenmaterials nicht durchgeführt werden.

In den folgenden Abb. 6.9 und 6.10 sind die erhaltenen TXRF-Ergebnisse dargestellt. Im Fall der DFPase (Abb. 6.9) zeigt sich eine sehr gute lineare Beziehung zwischen den zu erwartenden und den gemessenen Calcium-Gehalten. Die lineare Regression weist einen R-Wert von 0,99993 auf. Die erhaltenen Wiederfindungen für Calcium liegen im Durchschnitt bei ≥ 97 % mit relativen Standardabweichungen von durchschnittlich 1 – 2 %. Der Calcium Cofaktor in der DFPase kann somit sicherlich genauer bestimmt werden als der hier vorgenommene kleinste Additionsschritt von 2 ng (0,5 mg/l) Ca. Aufgrund der sehr geringen Fehlerschwankungen der Einzelmessungen könnte man sogar von Fehlerschwankungen in der Calciumwiederfindung besser 0,2 ng (0,05 mg/l) sprechen. Diese Fehlerbreite bewirkt eine Unsicherheit in der Stöchiometrie des Cofaktors von $\pm 0,1$ Ca pro DFPase.

Für die Konzentrationsreihen mit Kupfer zu den beiden Enzymen Cytochrom *c* Oxidase und Cytochrom *c* Reduktase werden ähnlich gute lineare Beziehungen wie mit der DFPase erhalten (Abb. 6.10). Dabei ist die lineare Beziehung der Konzentrationsreihe im Fall der

⁵ *bc₁*-Cytochrom *c* Reduktase (Komplex III) aus *Paracoccus denitrificans*; $M_r = 126.000$ Da; 37-38 schwefelhaltige Aminosäuren; Cofaktoren: 5 Fe pro Enzym

Cytochrom *c* Oxidase etwas schlechter (R-Wert: 0,996) als im Fall der Cytochrom *c* Reduktase (R-Wert: 0,9997). Die Wiederfindungen sowohl in dem kupferhaltigen Enzym (Cytochrom *c* Oxidase) als auch in der Vergleichsprobe des kupferfreien Enzyms (Cytochrom *c* Reduktase) liegen somit innerhalb eines Toleranzbereiches von $\pm 5\%$. Auch hier zeigen sich relative Standardabweichungen von durchschnittlich 1 – 2 %.

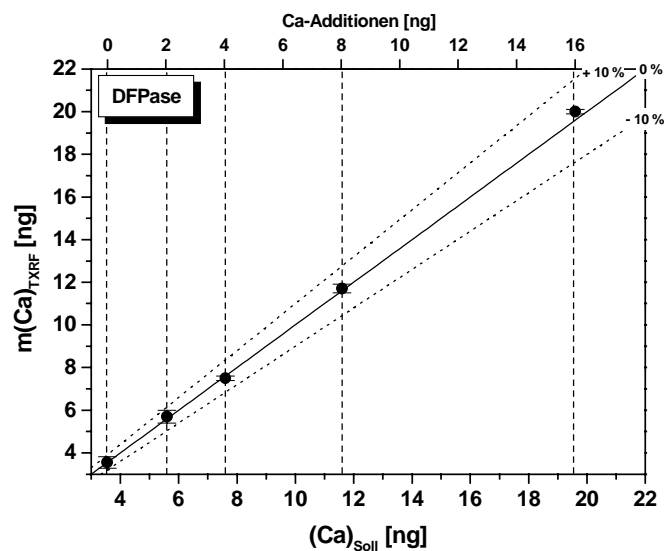


Abb. 6.9: Ca-Konzentrationsreihe in DFPase. Ausgehend von einem Cofaktoren-Grundgehalt (2 Ca pro DFPase) von 3,6 ng (1 mg/l) Ca erfolgten Additionen 2 ng, 4 ng, 8 ng und 16 ng Ca. Anregungsstrahlung: Mo-K α .

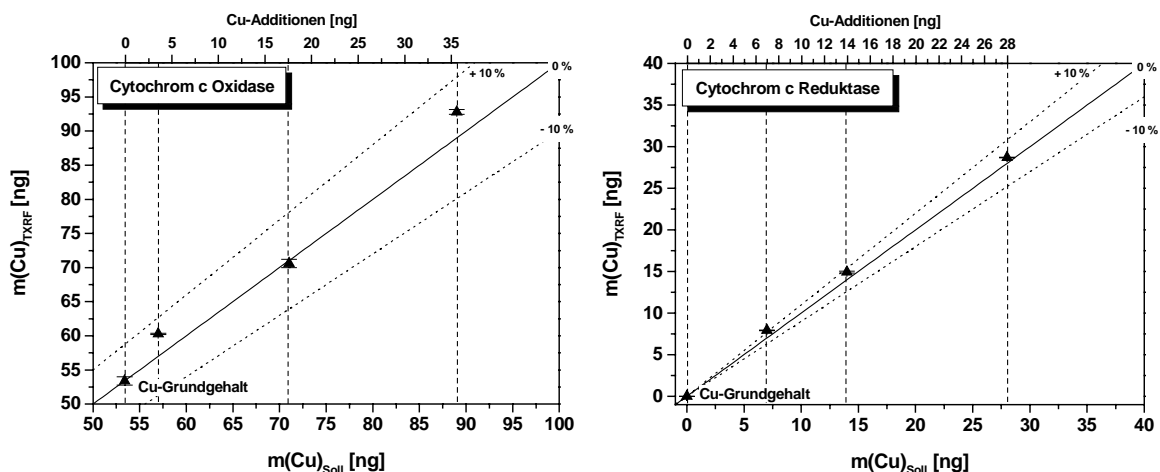


Abb. 6.10: links: Cu-Konzentrationsreihe in Cytochrom *c* Oxidase. Ausgehend von einem Cofaktoren-Grundgehalt (3 Cu pro Cytochrom *c* Oxidase) von 53 ng Cu erfolgten Additionen 3,6 ng, 18 ng und 36 ng Cu; rechts: Cu-Konzentrationsreihe in der Cytochrom *c* Reduktase. Ausgehend von keinem Kupfer Cofaktor erfolgten Additionen 7 ng, 14 ng und 28 ng Cu; Anregungsstrahlung: Mo-K α .

Geht man nach der hier durchgeführten Konzentrationsreihe, bei der im ersten Additionsschritt ein Zusatz von 3,6 ng (3,5 mg/l) Cu zur Cytochrom *c* Oxidase erfolgte, so kann der

Cofaktor in diesem Bereich mit guter Präzision bestimmt werden. Dies würde eine Unsicherheit in der Kupfer Stöchiometrie von $\pm 0,5$ Cu pro Enzym bedeuten. Allerdings wird auch hier, wie schon bei der DFPase, aufgrund der geringen Fehlerschwankungen der Einzelmessungen eine höhere Genauigkeit erreicht. Danach kann Kupfer auf mindestens $\pm 1 - 1,5$ ng genau bestimmt werden (entsprechend Schwankungsbreiten $\pm 0,1 - 0,2$ Cu pro Cytochrom *c* Oxidase). Für die nicht kupferhaltige Cytochrom *c* Reduktase gelten die selben Ausführungen. Auch hier wird das Kupfer nach der durchgeführten Konzentrationsreihe auf mindestens $\pm 0,2$ Cu pro Cytochrom *c* Reduktase bestimmt.

ZUSAMMENFASSUNG

Für die beiden kleineren der hier betrachteten Enzyme, die DFPase und die Cytochrom *c* Oxidase, konnten bei den durchgeführten Konzentrationsreihen mit schwefelhaltigen Standardlösungen über den gesamten Konzentrationsbereich sehr gute Wiederfindungen des Elementes Schwefel dokumentiert werden. Dies konnte für beide Anregungsmodi ($W-L\alpha$ und $Mo-K\alpha$) gleichermaßen festgestellt werden. Im Fall des Komplex I zeigten sich mit zunehmendem anorganischen Matrixanteil der zugesetzten Additionslösungen auch zunehmende Minderbefunde in der Schwefelbestimmung. Diese Ergebnisse gingen synchron mit erhaltenen massiveren Probenrückständen. Im Gegensatz dazu haben die unterschiedlichen Stärken der untersuchten Enzymmatrices keinerlei Einflüsse auf die Genauigkeit der Cofaktoren Bestimmung. Es waren in den durchgeführten Konzentrationsreihen keinerlei Absorptionseffekte festzustellen. Für das Enzym mit dem größten Matrixanteil, den Komplex I, bleibt diese Aussage allerdings offen, da aufgrund mangelndem Probenmaterials keine Versuchsreihe mehr durchgeführt werden konnte.

KAPITEL VII

Beeinflussung der Rückstandsbildung

Schichtdickeneffekte, hervorgerufen durch die bio-organische Enzymmatrix und die verwendeten Puffermedien mit ihren Salzen und Detergentien, haben einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf die Elementwiederfindungen bei TXRF Analysen. Präparationen von Enzymen unterschiedlicher Molekulargewichte und Pufferzusammensetzungen (Eintrocknung von 5 µl Probenvolumen auf siliconisierte Quarzprobenträger) zeigten in Abhängigkeit des Enzyms und der Enzymkonzentration zum Teil deutliche Minderbefunde in der Schwefelbestimmung. Besonders deutlich tritt dies bei stark salzhaltigen Puffersystemen in Erscheinung [70]. Die Gründe sind in starken Krustenbildungen der Trocknungsrückstände und hohen Elementkonzentrationen der detektierbaren Pufferelemente zu suchen, die zu einer Erhöhung des Untergrundes durch Streustrahlungen, sowie zur Eigenabsorption der leichten Elemente führen. Dennoch sind die Puffersysteme bei der Analyse von Proteinen oder Enzymen eine Notwendigkeit, da sie deren Stabilisierung bis zu ihrer Messung ermöglichen. Abtrennung der Probenmatrices durch Aufschlussmethoden wie etwa Druckaufschlüsse mit konzentrierter Salpetersäure oder direkter Plasmaveraschung auf den Probenträgern im O₂/Mikrowellenplasma sind aufgrund möglicher Verluste von Schwefelanteilen durch Bildung flüchtiger Schwefelverbindungen problematisch [26]. Vor allem anorganisch gebundener Schwefel, wie er in Fe-S-Clustern bei bestimmten Enzymen vorliegen kann, entzieht sich unter diesen Bedingungen der Detektion durch Bildung von Schwefelwasserstoff.

Eine Verbesserung der Bestimmung von Spurenelementkonzentrationen in bio-organischen Makromolekülen konnte schon durch Verwendung eines rein organischen Puffersystems (Tris/Acetat-Puffer) und die „Dünnschichtpräparation“ mit unsiliconierten Quarzprobenträgern erreicht werden [70]. Um die Schichtdickeneffekte noch weiter minimieren zu können, wurde der Effekt von sogenannten Filmbildnern oder „Glättungsmitteln“ bei der Präparation von Enzymproben untersucht. Die Wirkung von z.B. mehrwertigen Alkoholen wie Polyvinylalkohol (PVA) auf die Rückstandsbildung von verschiedenen Materialien ist in der Literatur schon mehrfach beschrieben [77-79].

7.1 Wirkungsweisen der Filmbildner

Die als Filmbildner für die Probenpräparation von TXRF-Analysen verwendeten Verbindungen sind grenzflächenaktive Stoffe, die die Grenzflächen- bzw. Oberflächenspannung von 2-Phasensystemen herabsetzen. Polare Lösungen weisen auf hydrophoben Oberflächen eine hohe Grenzflächenspannung auf, wodurch es zur typischen Tropfen-Ausbildung der Lösung kommt. Diese ist für die TXRF-Probenpräparation erwünscht, da es sonst zu einem Verlaufen der Probenlösung über die erfassbare Detektorfläche hinaus kommt. Aus diesem Grund erfolgt eine Siliconisierung der für die TXRF-Analysen verwendeten Quarzprobenträger, die den Trägeroberflächen diese hydrophobe Eigenschaft verleihen. Nachteilig wirkt sich dies allerdings bei Proben mit hohen Matrixanteilen aus. Die Kontraktion der Lösung zur kleinen Tropfenform führt zur Ausbildung massiver Rückstände und somit zu einer Erhöhung des spektralen Untergrundes aufgrund der Vergrößerung des Comptonstreuquerschnitts. Gelingt es durch den Zusatz von grenzflächenaktiven Stoffen die Grenzflächenspannung herabzusetzen, neigt die aufgebrauchte Probenlösung mehr zum Verlaufen innerhalb des erfassbaren Bereiches und kann so eine Herabsetzung der Rückstandshöhen bewirken.

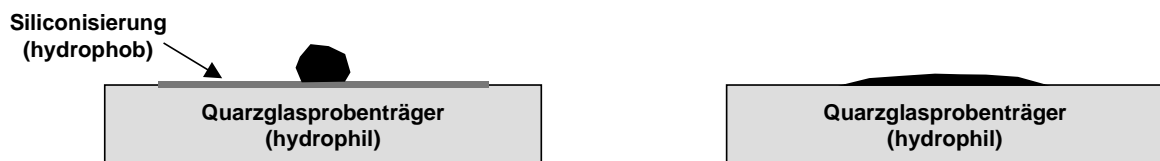


Abb. 7.1: Rückstandsbildung auf hydrophilen und hydrophoben Oberflächen (schematisch).

7.2 Probenpräparation

Abb. 7.2 zeigt den Ablauf der Probenpräparation. Die Untersuchungen der Zusätze von Filmbildnern erfolgten an den drei Enzymkomplexen von DFPase, Cytochrom *c* Oxidase und Komplex I. Dazu wurden die Enzyme zuerst mit einem internen Standard versetzt. Anschließend wurden jeweils 4 µl der Probenlösungen auf siliconisierte und unsiliconisierte Quarzprobenträger aufgebracht und an Luft bei Raumtemperatur eingetrocknet. Aufgrund der hydrophilen Oberflächenbeschaffenheit von unsiliconisierten Probenträgern kommt es dabei nicht zu der Ausbildung eines kleinen, tropfenförmigen Rückstandes, sondern zu einem stärkeren Verlaufen der Probenlösung. Zusätzlich wurden den auf siliconisierten Trägern aufgebrauchten Probenlösungen vor dem Eintrocknungsvorgang 2 µl des Filmbildner zugemischt. Die so präparierten Enzymproben wurden mit TXRF bei W-L α - und Mo-K α -Anregung vermessen. Die Trocknungsrückstände wurden auf ihre Schichtdicke und Topologie mittels *ALPHA*-Step und REM untersucht.

Als Filmbildner wurden folgende Substanzen verwendet:

- Polyvinylalkohol (PVA), 0,01 %
- Gelatinelösung, 0,1 %, sowie
- Äpfelsäure, 1 % (nur bei DFPase)
- Flusssäure (HF), 1 %

Der Zusatz der Flusssäure greift auf den gleichen Effekt wie durch Verwendung der unsilicinierten Probenträger zurück. Hier erfolgt eine Entfernung der Siliconisierung mit verdünnter HF innerhalb eines begrenzten Bereiches. Dieses Verfahren wird häufig bei Messungen von Suspensionen verwendet, bei denen sich die dabei entstehende minimale Vertiefung in der Siliconschicht als vorteilhaft erwiesen hat. Nachteilig wirkt sich allerdings die schleichende Schädigung der Quarzglasprobenträgeroberfläche aus. Desweiteren bedingte der Zusatz von Fluss- oder Äpfelsäure zu den Proben eine Denaturierung des jeweiligen Enzyms.

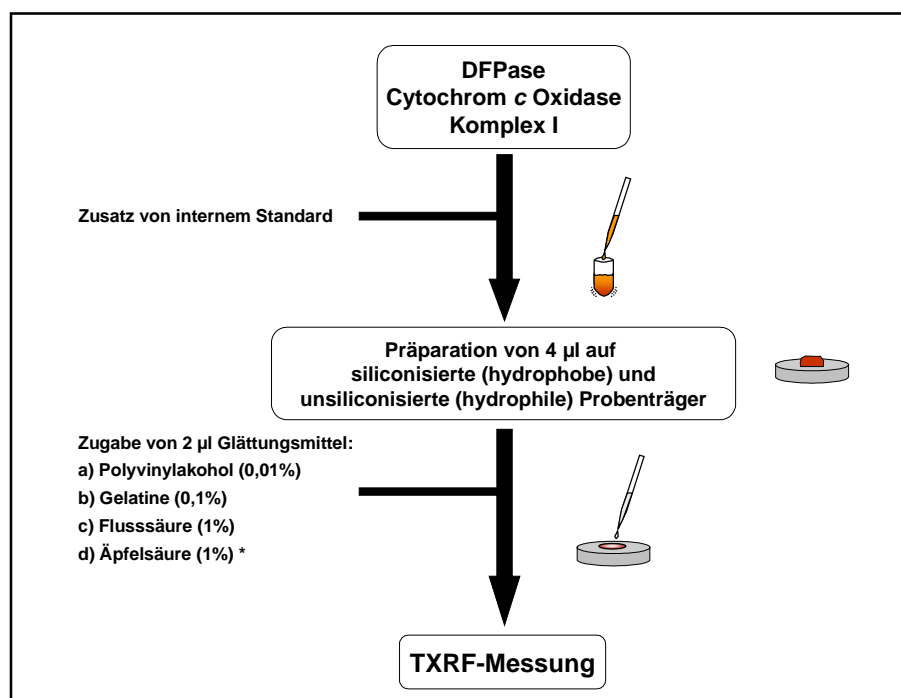


Abb. 7.2: Probenpräparation zur Untersuchung der Rückstandsbildung von Enzymproben bei Zusatz von Filmbildnern; Interne Standards: DFPase: 1 mg/l Mn, Cytochrom *c* Oxidase und Komplex I: 2,5 mg/l Cr; * der Zusatz von Äpfelsäure erfolgte nur zur DFPase.

7.3 TXRF-Ergebnisse

7.3.1 Diisopropylfluorophosphatase (DFPase)

Auf die Bestimmung von Schwefel in der DFPase haben die Zusätze der Filmbildner nach Abb. 7.3 einen eher nachteiligen Effekt. Im Fall der Präparation mit Gelatine, Flusssäure und Äpfelsäure zeigen sich deutliche Unterschiede in der Schwefeldetektion. Diese rühren zum einen von Schwefelblindwerten in der Gelatine, zum anderen von der Denaturierung des Enzyms bei der Präparation mit HF und Äpfelsäure her. Mit der standardmäßigen Präparation auf siliconisierten (hydrophoben) bzw. unsiliconierten (hydrophilen) Probenträgern, sowie bei Zusatz von PVA werden die besten Ergebnisse bezüglich Wiederfindung und Messfehler erreicht.

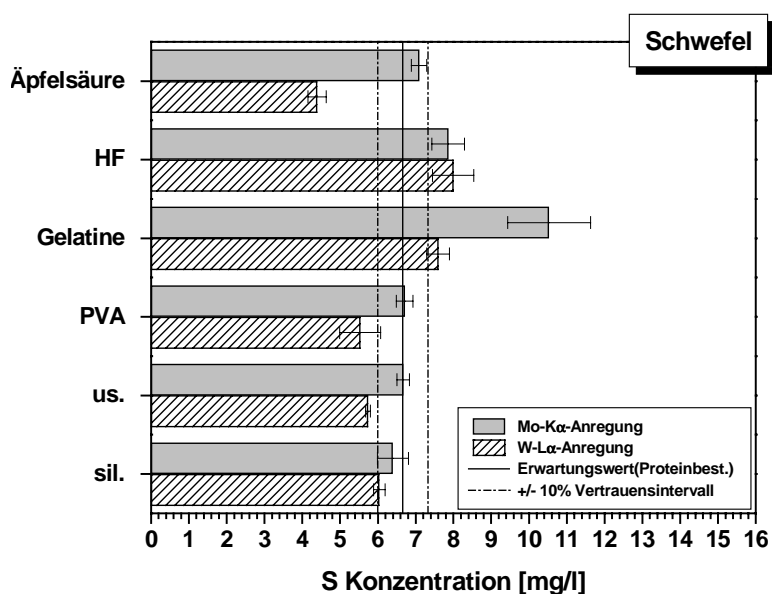


Abb. 7.3: DFPase: Auswirkungen von Filmbildnern auf die Elementdetektion von Schwefel im Vergleich zur herkömmlichen Präparation auf siliconisierten (sil.) und unsiliconierten (us.) Probenträgern; W-L α - und Mo-K α -Anregung im Vergleich; als Erwartungswert die nach der biochemischen Proteinbestimmung⁽¹⁾ zu erwartende Schwefelkonzentration innerhalb eines 10 %igen Vertrauensintervalls.

Auf die Bestimmung des Cofaktors der DFPase, Calcium, haben die Filmbildner dagegen fast keinen Einfluss (Abb. 7.4). Die leicht höheren Abweichungen bei Zusatz von Gelatine rühren auch hier wiederum von erhöhten Blindwerten her; für Äpfelsäure werden zu niedrige Calciumkonzentrationen gefunden. Sollte es aufgrund der Denaturierung zu einer Ausfällung von Calciummalat auf dem Probenträger gekommen sein, wäre das Element trotzdem nicht der Detektion entzogen.

¹ Proteinkonzentration: 0,456 mg/ml (13 μ M)

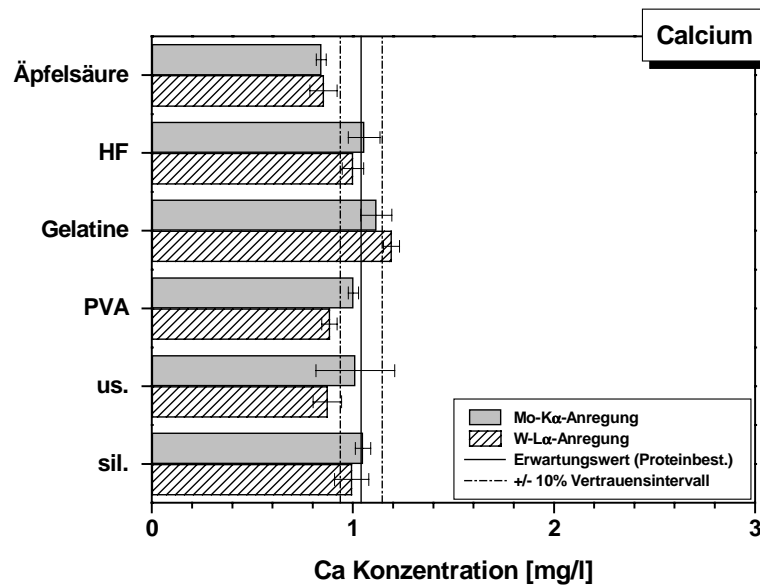


Abb. 7.4: DFPase: Auswirkungen von Filmbildnern auf die Elementdetektion von Calcium im Vergleich zur herkömmlichen Präparation auf siliconisierten (sil) und unsiliconierten (us.) Probensträgern; W-L α - und Mo-K α -Anregung im Vergleich; als Erwartungswert die nach der biochemischen Proteinbestimmung zu erwartenden Calciumkonzentrationen innerhalb eines 10 %igen Vertrauensintervalles.

Die Einflüsse der Filmbildner auf die Elementkonzentrationen von Schwefel und Calcium haben natürlich weiterführende Auswirkungen auf die zu berechnenden Metall-Stöchiometrien in Abb. 7.5. Die erwartete Stöchiometrie von 2 mol Ca pro mol DFPase wird mit beiden Anregungsmodi nur im Fall der herkömmlichen Präparation auf siliconisierten und unsiliconierten Probensträgern, sowie bei Zusatz von PVA erreicht. Bei den anderen Präparationen werden im Schnitt zu geringe Stöchiometrien berechnet.

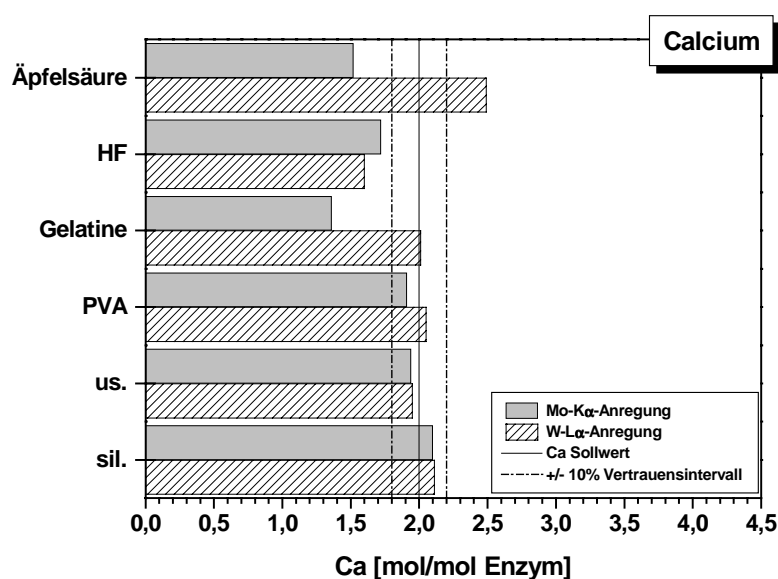


Abb. 7.5: DFPase: Metall-Stöchiometrien pro Komplex DFPase bei Zusatz von Filmbildnern in Abhängigkeit von der Anregungsstrahlung (erwartet werden 2 mol Ca pro mol DFPase).

7.3.2 Cytochrom *c* Oxidase

Im Fall der Cytochrom *c* Oxidase zeigen die zugesetzten Filmbildner im Vergleich zu den standardmäßig verwendeten Präparationen innerhalb des gewählten Anregungsmodus keinen signifikanten Unterschied in den bestimmten Schwefelkonzentrationen (Abb. 7.6). Eine Ausnahme stellt allerdings der Zusatz von HF dar: Aufgrund der Denaturierung des Enzyms werden bei Mo-K α -Anregung (nicht bei W-L α -Anregung) um 20 % höhere Schwefelkonzentrationen detektiert. Die Schwefelkonzentrationen liegen bei W-L α -Anregung insgesamt um rund 10 % unterhalb der mit Mo-K α -Anregung bestimmten. Bei der untersuchten Probe der Cytochrom *c* Oxidase lag keine Proteinbestimmung vor, so dass ein Vergleich der mit TXRF bestimmten Schwefel- und Metallkonzentrationen mit dem aus der biochemisch bestimmten Proteinkonzentration hervorgehenden Schwefelgehalt nicht vorgenommen werden konnte.

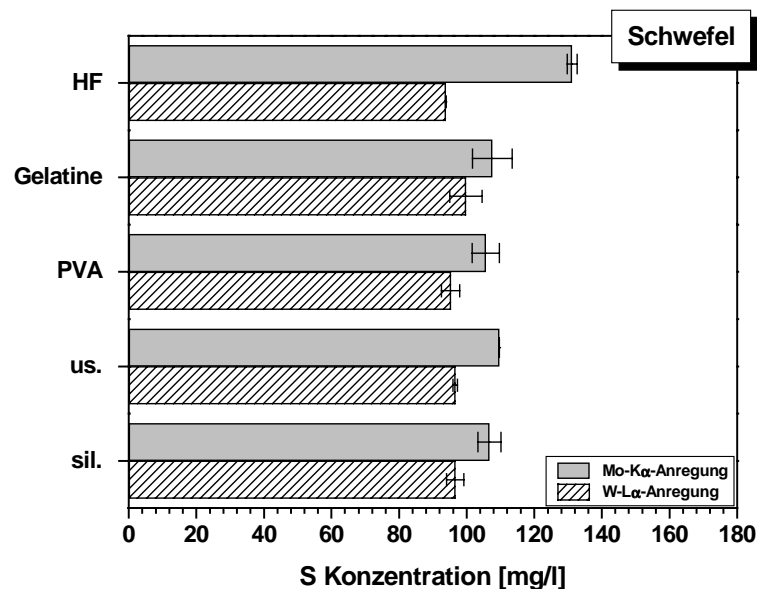


Abb. 7.6: Cytochrom *c* Oxidase: Auswirkungen von Filmbildnern auf die Elementdetektion von Schwefel im Vergleich zur herkömmlichen Präparation auf siliconisierten (sil.) und unsiliconisierten (us.) Probenträgern; W-L α - und Mo-K α -Anregung im Vergleich.

Wie schon bei der DFPase zeigt sich auch bei der Cytochrom *c* Oxidase, dass die Zusätze der Filmbildner keinerlei erkennbare Auswirkungen auf die Bestimmung der Metall Cofaktoren Calcium, Eisen und Kupfer haben (Abb. 7.7). Ein Vergleich der beiden Anregungsmodi zeigt aber auch hier Unterschiede von 20 % bezüglich der bestimmten Metallgehalte.

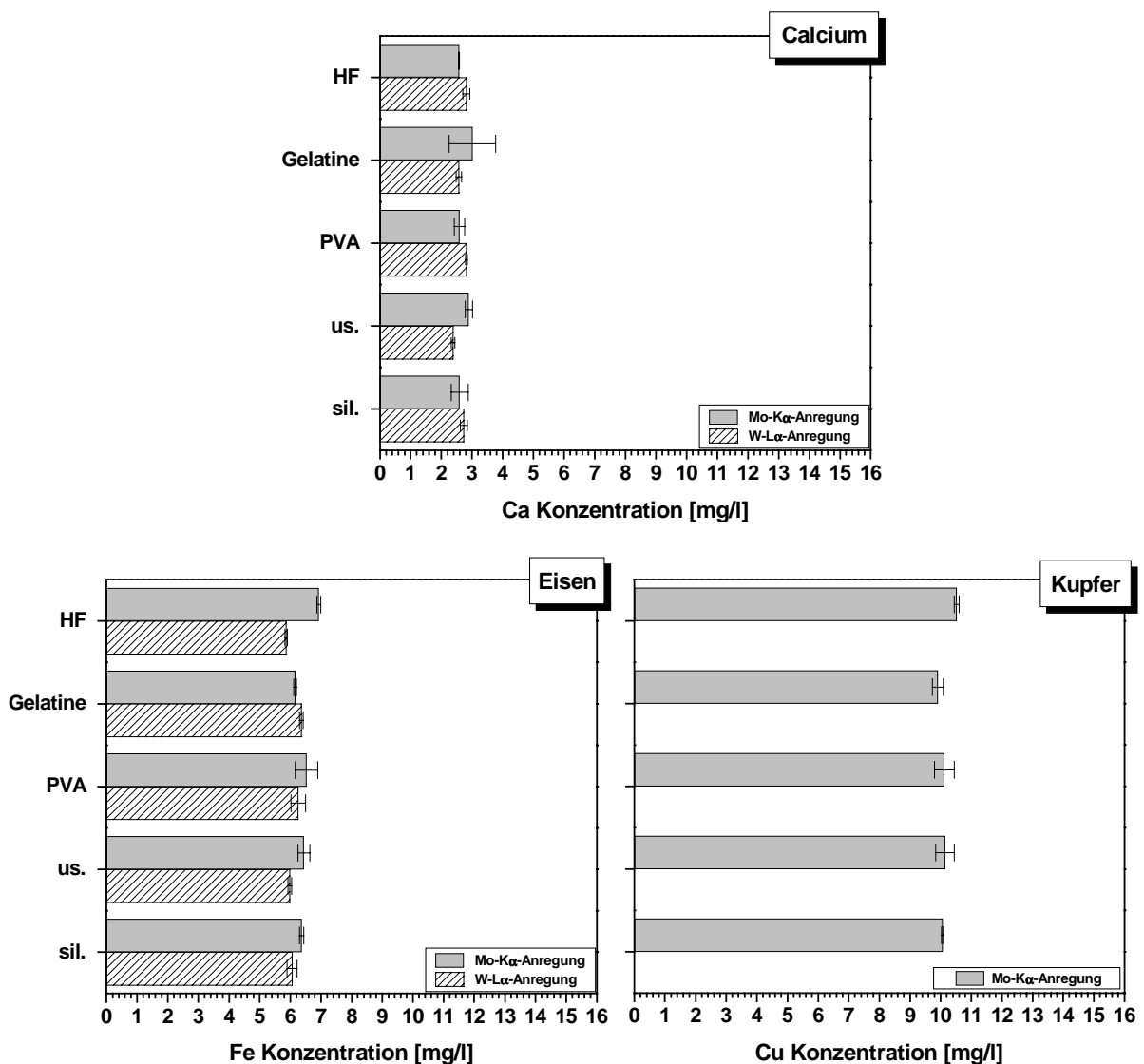


Abb. 7.7: Cytochrom *c* Oxidase: Auswirkungen von Filmbildnern auf die Elementdetektion der Cofaktoren Calcium, Eisen und Kupfer im Vergleich zur herkömmlichen Präparation auf silicisierten (sil.) und unsilicisierten (us.) Probenträgern; W-L α - und Mo-K α -Anregung im Vergleich (Cu ist nicht mit W-L α -Anregung bestimmbar).

Abb. 7.8 stellt die Wiederfindungsraten der berechneten Elementstöchiometrien für die Cofaktoren pro Komplex Cytochrom *c* Oxidase dar. Es werden pro mol Komplex Cytochrom *c* Oxidase 1 mol Ca, 2 mol Fe und 3 mol Cu erwartet. Der Kupfergehalt wurde nur über Mo-K α -Anregung bestimmt. Die Berechnung der Kupfer-Stöchiometrien erfolgte dann über die mit W-L α -Anregung ermittelte Proteinkonzentration (über die Bestimmung des Schwefelgehaltes). Die Berechnung der Stöchiometrien für Calcium und Eisen erfolgte dagegen jeweils über die mit der entsprechenden Anregung bestimmten Elementgehalte. Die sich ergebenden Stöchiometrien zeigen im Fall der W-L α -Anregung für Eisen und Kupfer sehr gute Übereinstimmungen mit den Erwartungswerten. Für Ca zeigt sich eine zu

hohe Stöchiometrie, die auf Blindwertkontaminationen zurückzuführen ist. Aus der Betrachtung der zu niedrigen Stöchiometrie-Wiederfindungsraten bei Mo-K α -Anregung kann man folgern, dass die bestimmte Schwefelkonzentration zu hoch ist. Insgesamt gesehen, spiegeln sich die geringen Auswirkungen der Glättungsmittelzusätze aber auch in den berechneten Stöchiometrien wieder, wo zwischen den Präparationsarten nur geringe Unterschiede auszumachen sind.

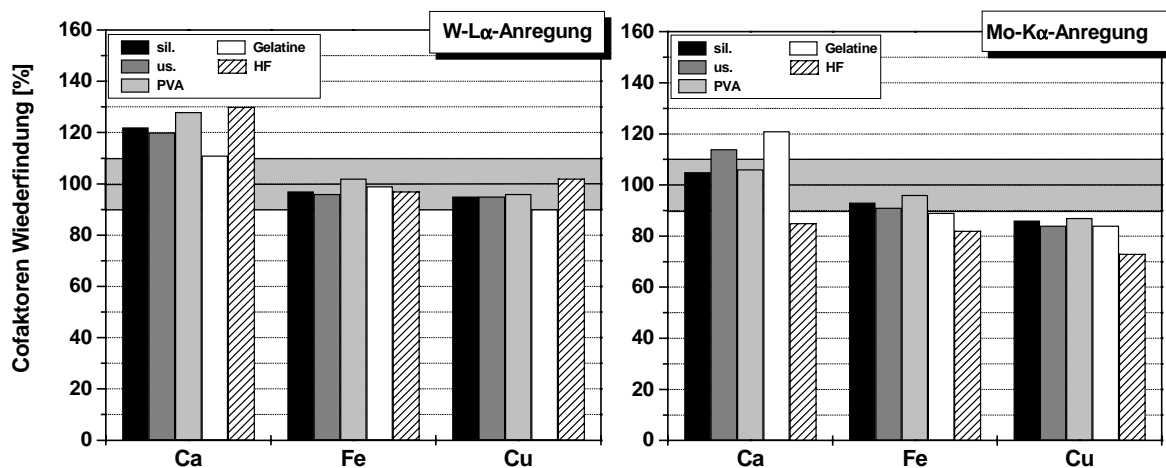


Abb. 7.8: Wiederfindung der Metall-Stöchiometrien pro Komplex Cytochrom *c* Oxidase bei Zusatz von Filmbildnern in Abhängigkeit von der Anregungsstrahlung: W-L α (links) und Mo-K α (rechts); erwartet werden 1 mol Ca, 2 mol Fe und 3 mol Cu pro mol Cytochrom *c* Oxidase.

7.3.3 NADH:Q Oxidoreduktase (Komplex I)

Die Ergebnisse der Zusätze verschiedener Filmbildner im Vergleich zu den standardmäßig verwendeten Präparationsarten auf siliconisierten oder unsiliconisierten Probenträgern in Abb. 7.9 zeigen für den Komplex I ein ähnliches Bild wie bei der Cytochrom *c* Oxidase. Im Mo-K α -Anregungsmodus ergeben sich auch hier mit Ausnahme des HF-Zusatzes keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Präparationsarten. Diese sind im Fall der W-L α -Anregung wesentlich deutlicher. Außerdem weisen die bestimmten Schwefelkonzentrationen sehr starke Minderbefunde im Vergleich zu der nach der biochemischen Proteinbestimmung erwarteten Schwefelkonzentration auf. Die aufgrund der höheren Matrixanteile im Komplex I anscheinend stattfindende Absorption der Fluoreszenzstrahlung von Schwefel kann auch durch die Verwendung von Filmbildnern nicht kompensiert werden.

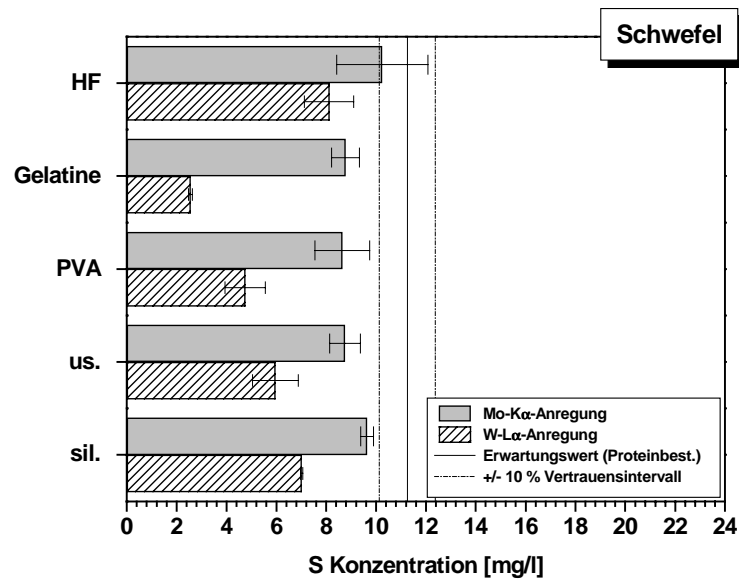


Abb. 7.9: Komplex I: Auswirkungen von Filmbildnern auf die Elementdetektion von Schwefel im Vergleich zur herkömmlichen Präparation auf siliconisierten (sil.) und unsiliconierten (us.) Probenträgern; W-L α - und Mo-K α -Anregung im Vergleich; als Erwartungswert die nach der biochemischen Proteinbestimmung⁽²⁾ zu erwartende Schwefelkonzentration innerhalb eines 10 %igen Vertrauensintervalles.

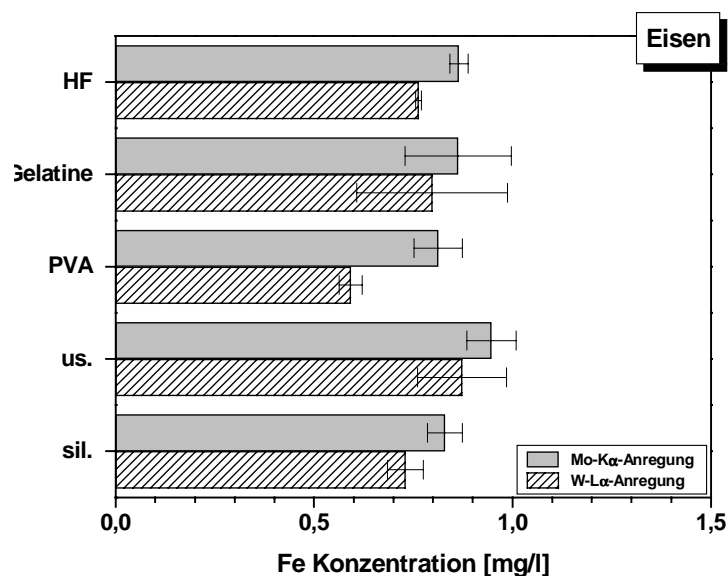


Abb. 7.10: Komplex I: Auswirkungen der Filmbildner auf die Elementdetektion des Cofaktors Eisen im Vergleich zur herkömmlichen Präparation auf siliconisierten (sil.) und unsiliconierten (us.) Probenträgern; W-L α - und Mo-K α -Anregung im Vergleich.

Auf die Bestimmung des aus den Fe-S-Clustern im Komplex I stammenden Eisens haben die Präparationsarten bzw. Filmbildnerzusätze und Anregungsmodi keine einheitlichen Einflüsse. Auffällig sind zudem hohe relative Standardabweichungen. Da die genaue An-

² Proteinkonzentration: 0,74 mg/ml (0,78 μ M)

zahl und Art der Fe-S-Cluster nicht bekannt ist, wurde auf die Einbeziehung eines Bezugswertes in Abb. 7.10 verzichtet.

In Abb. 7.11 ist die anhand der mit TXRF bestimmten Schwefel- und Eisenkonzentrationen berechnete Anzahl der Eisenatome pro Komplex I dargestellt. Aufgrund der Minderbefunde in der Schwefelbestimmung bei Anregung mit W-L α werden höhere Stöchiometrien als erwartet berechnet. Insgesamt ist aus den Ergebnissen zu erkennen, dass die Zusätze der verschiedenen Filmbildner keine genauere Eingrenzung der Anzahl der Eisenzentren von 22 ± 2 im Komplex I erlauben.

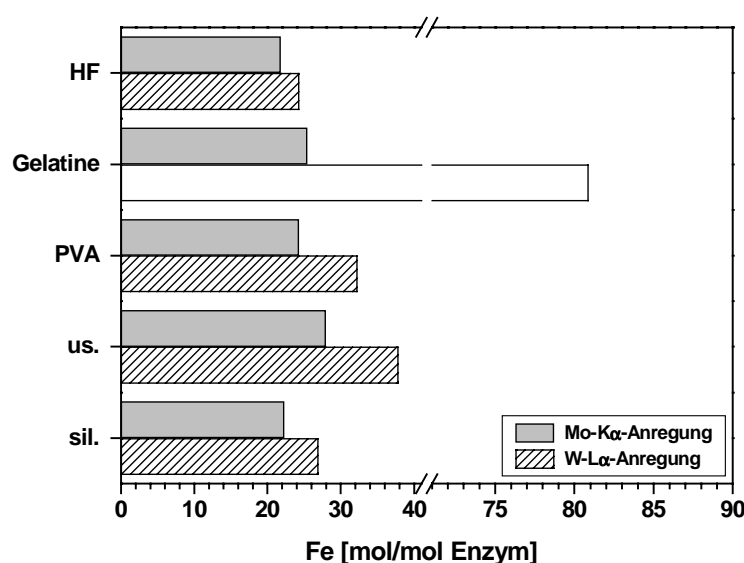


Abb. 7.11: Metall-Stöchiometrien pro Komplex I bei Zusatz von Filmbildnern in Abhängigkeit von der Anregungsstrahlung (erwartet werden 22 ± 2 mol Fe pro mol Komplex I).

7.4 Topologische Untersuchungen

Von den Trocknungsrückständen der verschiedenen Präparationsarten bei der DFPase waren keine *ALPHA*-Step Aufnahmen möglich. Die Nadel durchdrang den jeweils zu weichen Rückstand, was die Aufnahme von Höhenprofilen verhinderte. In Anhang A findet sich eine Zusammenstellung der entsprechenden REM-Aufnahmen.

Vergleicht man die Höhenprofilaufnahmen der Trocknungsrückstände von Cytochrom *c* Oxidase (REM-Aufnahmen der Trocknungsrückstände in Anhang A) und Komplex I, so zeigen sich unabhängig von Präparationsart bzw. Filmbildner Schichtdicken von $< 10 \mu\text{m}$. Im direkten Vergleich der Präparationsarten zeigen die Filmbildnerzusätze keine deutliche

Reduzierung der Schichtdicke, eine Änderung des Rückstandprofils erfolgt nicht. Die Rückstände weisen immer noch stärkere Krustenbildungen an den Rändern auf.

Die deutlich geringeren Rückstände des Komplex I im Vergleich zur Cytochrom *c* Oxidase trotz seines höheren Matrixanteils sind auf die geringe Enzymkonzentration zurückzuführen, die in dieser Probe vorlag. Besonders im Fall des Komplex I können die Trocknungsrückstände aber nicht die starken Differenzen in den Elementkonzentrationen zwischen den beiden Anregungsmodi erklären.

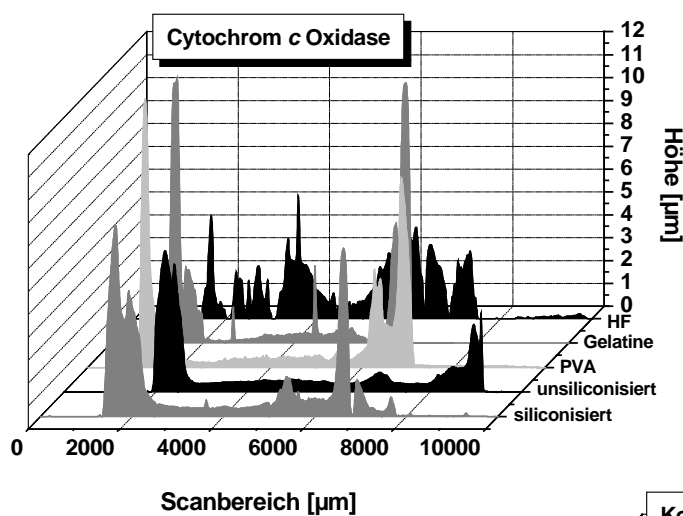
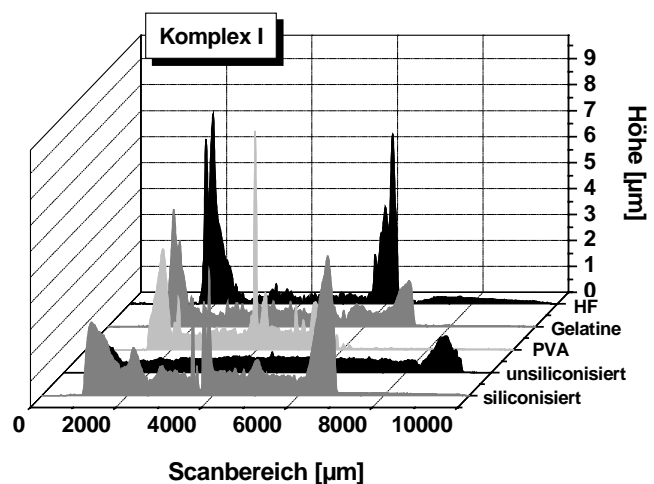


Abb. 7.12: ALPHA-Step Höhenprofil-aufnahmen der Trocknungsrückstände von Cytochrom *c* Oxidase und Komplex I im Vergleich zur herkömmlichen Präparation auf siliconierten und unsiliconierten Probenträgern und verschiedenen Zusätzen von Filmbildnern.



Zusammenfassung

Das Rückstandsverhalten der zu untersuchenden Probenlösungen hat bei TXRF-Analysen einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf die Elementbestimmung. Der Einsatz von Filmbildnern zur Herabsetzung der Oberflächenspannung von wässrigen Lösungen kann

eine bessere Rückstandsbildung ermöglichen. Zusätze von verschiedenen, in der Literatur bekannten, Filmbildnern (Polyvinylalkohol, Gelatine, Äpfelsäure), sowie von verdünnter Flusssäure brachten hier allerdings nicht die erhofften Erfolge. Auf die Rückstandsbildung der Trocknungsrückstände und somit auch auf die Bestimmung der Schwefelkonzentration in den zu untersuchenden Enzymproben haben die Filmbildner im Vergleich zu den herkömmlichen Präparationsmethoden (siliconisierte/unsiliconisierte Probenträger) fast keinen Einfluss. Problematisch ist dabei auch der Eintrag von Blindwerten bei bestimmten Filmbildnersubstanzen.

KAPITEL VIII

Anregung unter Verwendung einer Cr-K α -Strahlung zur besseren Detektion leichter Elemente

Einer der Nachteile konventioneller TXRF-Spektrometer ist die geringe Empfindlichkeit für die Analyse von leichten Elementen mit Ordnungszahlen $Z < 14$ (Silicium). Die K-Linien dieser Elemente (z. B. C, N, O, F, Na, Mg, Al) liegen im niederenergetischen Bereich zwischen 0,25 und 1,5 keV. Die untere Grenze im noch bestimmbar Elementbereich wird bei den konventionellen Spektrometern durch das Element Schwefel repräsentiert. Erst durch die Entwicklung eines für die Anregung und Detektion von niederenergetischen Röntgenstrahlen optimierten TXRF-Spektrometers ist die Bestimmung der leichten Elemente möglich [49-54]. Die Fa. GeMeTec (Gesellschaft für Messtechnik und Technologie mbH, München) entwickelte im Rahmen eines neuen, voll-automatisierten Wafer-Surface-Preparation-Systems (WSPS) zum Kontaminations-Monitoring von Si-Scheiben (Wafern) ein neues TXRF-Spektrometer (PADRAY). Unter Verwendung einer Chromröhre (Cr-K α) und mittels Integration des Analysensystems in eine Vakuumkammer ist dieses

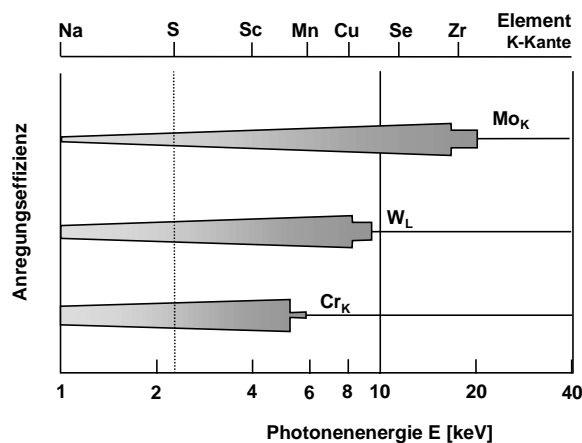
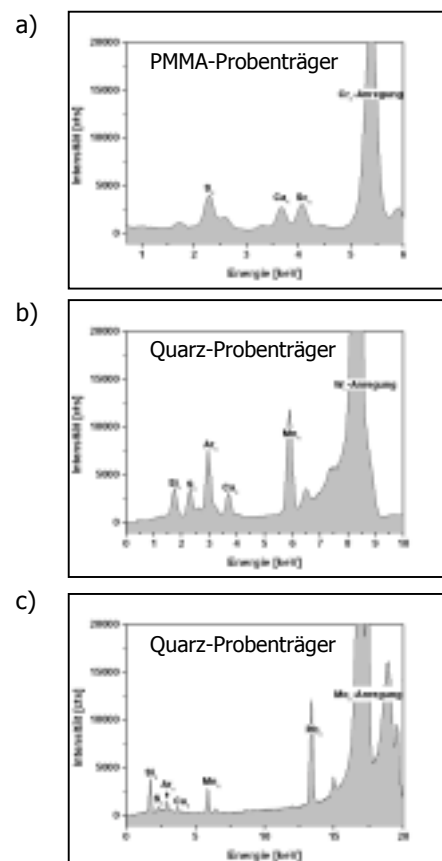


Abb. 8.1: Vergleich der Anregungseffizienzen von Cr-K α - (5,4 keV), W-L α - (8,4 keV) und Mo-K α - (17,4 keV) Röntgenstrahlungen in Abhängigkeit von der Ordnungszahl, insbesondere für das Element Schwefel (S-K α 2,3 keV).

Abb. 8.2: TXRF-Spektren bei Anregung mit a) einer Chromröhre (Cr-K α), b) einer Wolframröhre (W-L α) und c) einer Molybdänröhre (Mo-K α).



Spektrometer für die verbesserte Analyse von Natrium bis Titan konzipiert. Ein weiteres Verfahren der Wahl ist die Verwendung eines Polymer-Substrates als Probenenträgermaterial (PMMA – Polymethylmethacrylat). Der Vorteil ist hier im Fehlen des Silicium-Signals im Vergleich zu den im allgemeinen verwendeten Quarzglas-Probenenträger zu sehen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestand die Möglichkeit, einige Versuchsreihen mit diesem System durchzuführen und einen Vergleich der Schwefeldetektion zwischen den verwendeten Spektrometern und den zur Verfügung stehenden Anregungsmodi vorzunehmen (TXRF-Spektrometer Extra II A: W-L α - und Mo-K α -Anregungsmodus; TXRF-Spektrometer PADRAY: Cr-K α -Anregungsmodus). Zur Bestimmung der Schwefelwiederfindung mit der Cr-K α -Anregung im Vergleich zur W-L α - und Mo-K α -Anregung in unterschiedlichen Matrices wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt: Zum einen die Schwefelwiederfindung in einer rein wässrigen Matrix, zum anderen die Schwefel-Wiederfindung in einer Enzymmatrix. Für letztere Versuchsreihe wurde das Enzym Diisopropylfluorophosphatase (DFPase) gewählt.

8.1 Schwefel-Wiederfindung in wässriger Matrix

Zur Bestimmung der Schwefel-Wiederfindung wurden verschiedene Schwefelkonzentrationen (aus einer Schwefel-Stammlösung von 1.000 mg/l S aus Al₂(SO₄)₃) angesetzt (vgl. Tab. 8.1). Als interner Standard wurde den Proben 5 ng Sc (GeMeTec-Spektrometer PADRAY mit Cr-K α -Anregung) bzw. 5 ng Cr (Spektrometer Extra II A mit W-L α - und Mo-K α -Anregung) zugesetzt. Die Probenpräparation erfolgte anschließend auf PMMA-Probenenträger (PADRAY) bzw. auf Quarzglas-Probenenträger⁽¹⁾ (Extra II A).

S [ng]	500	100	10	1	0,1
Al [ng]	280	56	5,6	0,6	0,06

Tab. 8.1: Analytierte Schwefelgehalte aus einer wässrigen Al₂(SO₄)₃-Matrix. Zusätzlich wird der bei entsprechend eingestelltem Schwefelgehalt vorhandene Aluminiumgehalt dargestellt.

8.1.1 TXRF-Ergebnisse

In Abb. 8.3 sind die mittels TXRF bei unterschiedlichen Anregungsmodi erhaltenen Schwefelwiederfindungen dargestellt. Bei Verwendung der Cr-K α -Anregungsstrahlung erhält man bei Absolutmengen von 1 – 500 ng Schwefel Wiederfindungen von 65 – 85 %. Bei einer Absolutmenge von 0,1 ng S zeigt sich bei gleichzeitig höherer Standardabweichung ein deutlicher Mehrbefund an Schwefel. Bei diesem Gehalt ist die Nachweisgrenze

¹ Eine Messung mit Polymersubstraten (Plexiglas) als Probenenträgermaterial ist mit dem verwendeten Spektrometer Extra II A nicht möglich.

in der vorliegenden Matrix erreicht. Die gleiche Nachweisgrenze erhält man auch mit W-L α -Anregungsstrahlung. Auch hier wird bei einer Absolutmenge von 0,1 ng S ein deutlich zu hoher Schwefelgehalt detektiert. Ab einem Gehalt von 1 ng Schwefel kann der Schwefel in der vorliegenden wässrigen Al₂(SO₄)₃-Matrix gut innerhalb eines Vertrauensintervalls von $\pm 10\%$ bestimmt werden. Die Schwefel-Wiederfindungen liegen im Bereich von 90 – 100 %. Bei Verwendung der Mo-K α -Anregungsstrahlung für die Schwefelbestimmung wird wie zu erwarten eine deutlich schlechtere Nachweisgrenze erhalten. Konzentrationen von 0,1 ng und 1 ng S können bei Verwendung dieser Anregungsstrahlung nicht nachgewiesen werden. Bei Absolutmengen von 10 – 500 ng Schwefel beträgt die Schwefelwiederfindung 125 – 95 %. Der Schwefel kann hier also erst bei höheren Konzentrationen zuverlässig bestimmt werden.

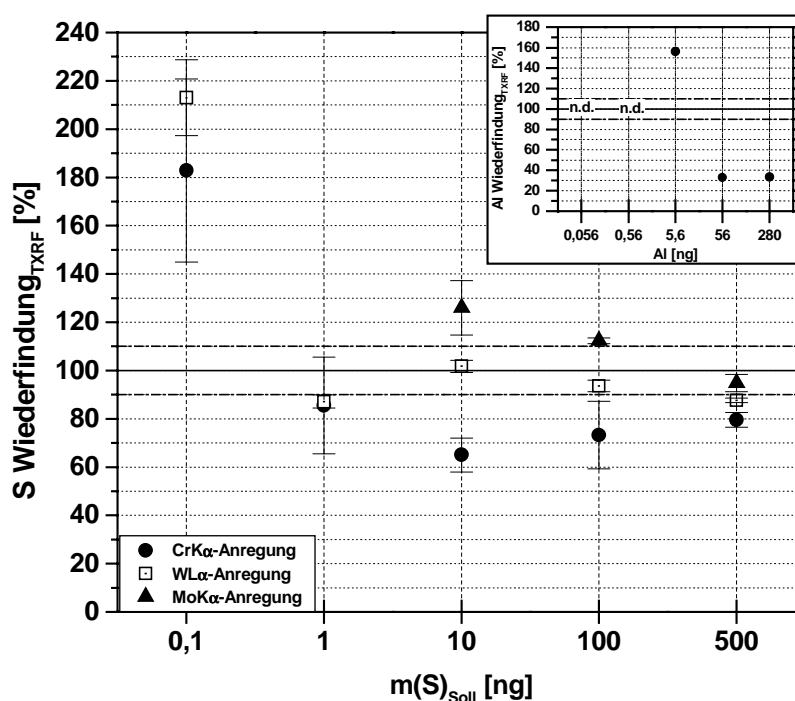


Abb. 8.3: Schwefel- und Aluminium-Wiederfindung in wässriger Matrix (Al₂(SO₄)₃); Vergleich der Anregungsmodi Cr-K α , W-L α und Mo-K α .

Die Geräteinstrumentation des GeMeTec-Spektrometers ermöglicht den Nachweis von leichteren Elementen als Schwefel. Aus diesem Grund sollte der Aluminiumgehalt der verwendeten Al₂(SO₄)₃-Stammlösung als Referenzelement fungieren (vergl. Tab. 8.1) und wurde ebenfalls bestimmt. Die Aluminium-Wiederfindungen sind in Abb. 8.3 ebenfalls dargestellt. Nachdem 0,1 ng S schon an der Nachweisgrenze liegen, ist bei dem um drei Ordnungszahlen kleineren Aluminium eine schlechtere Nachweisgrenze zu erwarten. Die experimentellen Befunde können dies bestätigen. Aluminium-Konzentrationen von 0,06 und 0,6 ng Al sind in der vorliegenden Matrix bei Verwendung des GeMeTec-Spektro-

meters mittels Cr-K α -Anregungsstrahlung nicht nachweisbar. Allerdings konnten auch höhere Konzentrationen von 5,6 – 280 ng Al nicht zuverlässig bestimmt werden. Es zeigte sich ein deutlicher Mehr- bzw. deutlicher Minderbefund.

8.1.2 Topologische Untersuchungen

Zur weiteren Interpretation der erhaltenen TXRF-Ergebnisse wurden die nach dem Trocknungsvorgang erhaltenen Probenrückstände mittels *ALPHA*-Step charakterisiert. Es stellte sich die Frage, inwieweit sich die Trocknungsrückstände der auf PMMA-Träger auf-gebrachten und mittels Cr-K α -Anregungsstrahlung vermessenen Proben von denen auf Quarz-Träger und mittels W-L α - bzw. Mo-K α -Anregungsstrahlung vermessenen Proben unterscheiden. In Abb. 8.4 sind die erhaltenen *ALPHA*-Step Höhenprofile der Probenrückstände anhand von drei ausgewählten Schwefelkonzentrationen dargestellt.

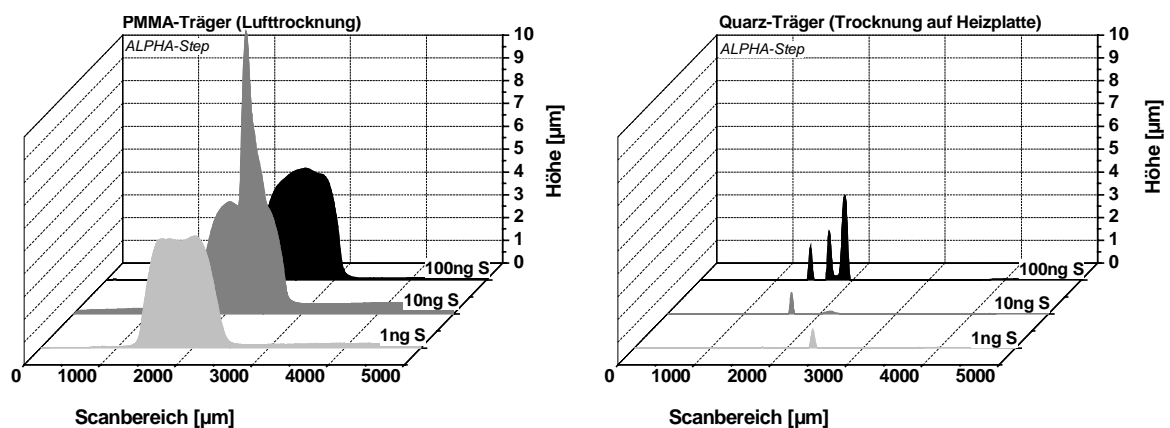


Abb. 8.4: *Alpha*-Step Höhenprofile der Trocknungsrückstände von ausgewählten Schwefelkonzentrationen aus einer wässrigen Al₂(SO₄)₃-Matrix; links: Trocknungsrückstände auf PMMA-Trägern nach Lufttrocknung bei Raumtemperatur; rechts: Trocknungsrückstände auf Quarz-Trägern nach Trocknung unter Wärmezufuhr (Heizplatte, 70 °C).

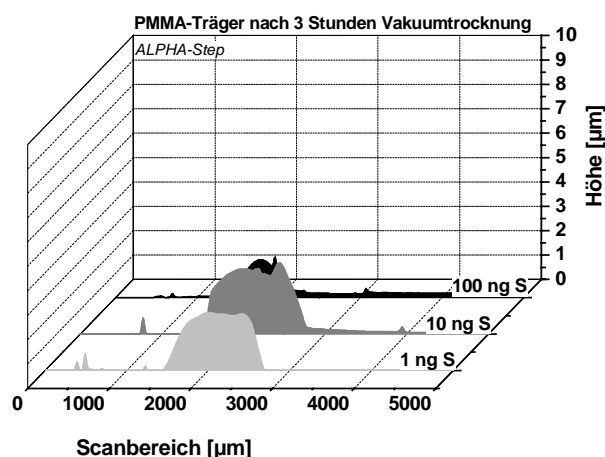


Abb. 8.5: *Alpha*-Step Höhenprofile der Trocknungsrückstände auf PMMA-Trägern, die nach Lufttrocknung bei Raumtemperatur (Abb. 8.4 links) nochmals drei Stunden im Vakuum getrocknet wurden.

Es zeigen sich deutliche Unterschiede im Profil der jeweiligen Trocknungsrückständen. Auf Quarz-Probenträgern, und der dadurch bestehenden Möglichkeit zur Trocknung unter Wärmezufuhr, resultieren in dem hier dargestellten Konzentrationsbereich Schichtdicken von maximal 4 μm . Der Rückstand ist, wie unter dem Mikroskop erkennbar, kristallin. Mit PMMA-Probenträgern ist eine Trocknung unter Wärmezufuhr nicht möglich, so dass in diesem Fall eine ein- bis zweistündige Lufttrocknung durchgeführt wurde. Auf eine Trocknung im Vakuum wurde zuerst verzichtet, um einem Verspritzen der Probenlösung während des Trocknungsvorganges entgegenzuwirken. Die *ALPHA*-Step Höhenprofile dieser Trocknungsrückstände weisen im Fall der 100 ng S-Probe eine vergleichbare Rückstandshöhe mit dem auf Quarzprobenträger erhaltenem Rückstand auf. Allerdings ist der auf PMMA-Trägern erhaltene Rückstand vermutlich aufgrund noch vorhandener Reste eingelagerten Wassers deutlich massiver. Dies lässt sich auch bei den beiden geringer konzentrierten Proben (1 ng und 10 ng S) beobachten. Erst nach mehrstündiger Trocknung im Vakuum können diese Wasserreste langsam entfernt werden, welches sich in den dann resultierenden Schichtdicken widerspiegelt (Abb. 8.5).

8.2 Schwefel-Wiederfindung in einer Enzymmatrix

Zur Bestimmung der Schwefelwiederfindung in einer Enzymmatrix mittels des GeMeTec-Spektrometers (PADRAY), wurden Standardadditionsversuche mit schwefelhaltigen Lösungen durchgeführt. Als Aufstocklösungen wurde der bereits für die Schwefelbestimmung in wässriger Matrix herangezogene anorganische Schwefelstandard ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) verwendet (Tab. 8.2).

S-Aufstocklösung			
1. Addition	2. Addition	3. Addition	4. Addition
1 ng S	5 ng S	10 ng S	20 ng S

Tab. 8.2: Für die Additionsversuche verwendete Schwefel-Aufstocklösungen.

Als interner Standard wurde den Proben 4 ng Sc (für Analyse mit PADRAY) bzw. 4 ng Mn (für Analyse mit Extra II A) zugesetzt. Die Probenpräparation erfolgte für die Analyse mittels Cr-K α -Anregung auf PMMA-Probenträgern und für die Analyse mittels W-L α - und Mo-K α -Anregung auf Quarzglas-Probenträgern. Als Enzymmatrix wurde die DFPase ausgewählt, das Enzym, mit dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten geringsten Molekulargewicht.

8.2.1 TXRF-Ergebnisse

Der durch die Aminosäuresequenz und die Enzymkonzentration⁽²⁾ vorgegebene Grundgehalt an Schwefel wurde zuerst mittels TXRF mit den vorhandenen Anregungsmodi (Cr-K α -, W-L α - und Mo-K α) bestimmt. Ausgehend von dem so bestimmten Grundgehalt wurden die Schwefelgehalte nach den einzelnen Schwefeladditionen berechnet und in Abb. 8.6 a-c gegen die experimentell bestimmten Schwefelgehalte aufgetragen.

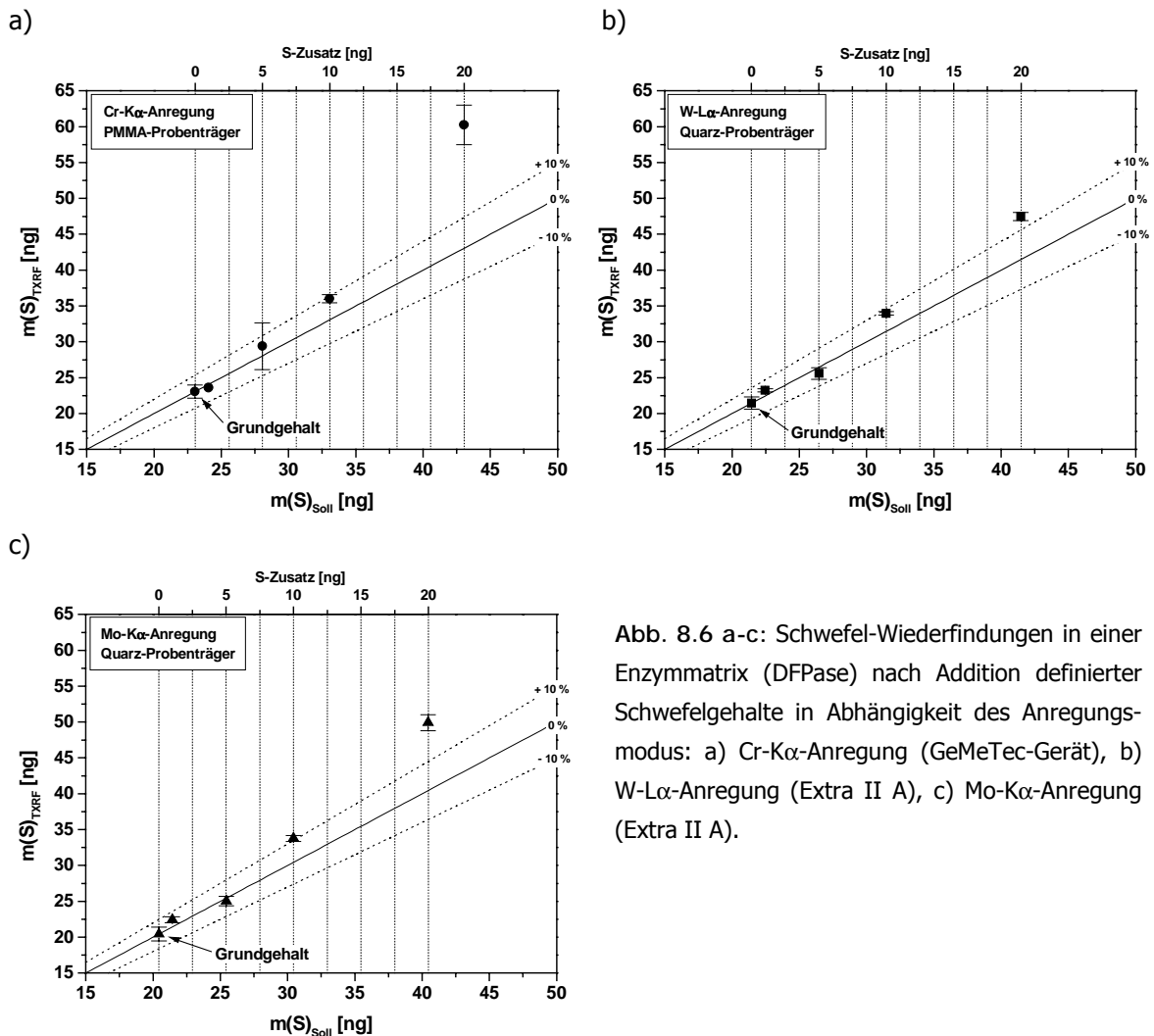


Abb. 8.6 a-c: Schwefel-Wiederfindungen in einer Enzymmatrix (DFPase) nach Addition definierter Schwefelgehalte in Abhängigkeit des Anregungsmodus: a) Cr-K α -Anregung (GeMeTec-Gerät), b) W-L α -Anregung (Extra II A), c) Mo-K α -Anregung (Extra II A).

Die mit den drei Anregungsmodi erhaltenen Schwefel-Wiederfindungen in der Enzymmatrix (DFPase) sind sehr gut. In den ersten drei Additionsschritten wird eine gute Korrelation zwischen den berechneten und experimentell bestimmten Werten erreicht. Im ersten und zweiten Additionsschritt liegen die Wiederfindungen bei 97 – 104 %, im dritten bei durchschnittlich 109 %. Eine Ausnahme bildet der letzte Additionsschritt. Hier wird in Abhängigkeit von der verwendeten Anregungsstrahlung ein deutlicher Mehrbefund von

² Enzymkonzentration: 0,44 mg/ml (12,5 μ M)

20 - 40 % in der Schwefel-Wiederfindung beobachtet, vermutlich verursacht durch eine fehlerhafte Standardisierung. Käme es hier zu Absorptionseffekten der Schwefel-Fluoreszenzstrahlung, wäre statt des Mehrbefundes ein Minderbefund der Wiederfindung aufgetreten. Eine alleinige Absorption der Fluoreszenzstrahlung des internen Standards (Sc bzw. Mn) würde zwar einen solchen hier beobachteten Mehrbefund bewirken. Dies sollte aber ausgeschlossen werden, da die Intensität der Scandium- bzw. Mangan-Fluoreszenzstrahlung größer als die des Schwefels ist: S-K α : 2,307 keV; Sc-K α : 4,088 keV; Mn-K α : 5,895 keV (vgl. auch Kap. 2.1.5).

In Abb. 8.7 wurden die TXRF-Ergebnisse mit dem aus der vorliegenden biochemischen Proteinbestimmung⁽²⁾ zu erwartenden Schwefel-Grundgehalt verglichen. Ausgehend von dem aus der Enzymkonzentration berechneten Schwefelgehalt wurden die zu erwartenden Schwefelgehalte berechnet und gegen die experimentell bestimmten Schwefelgehalte aus den drei Anregungsmodi aufgetragen.

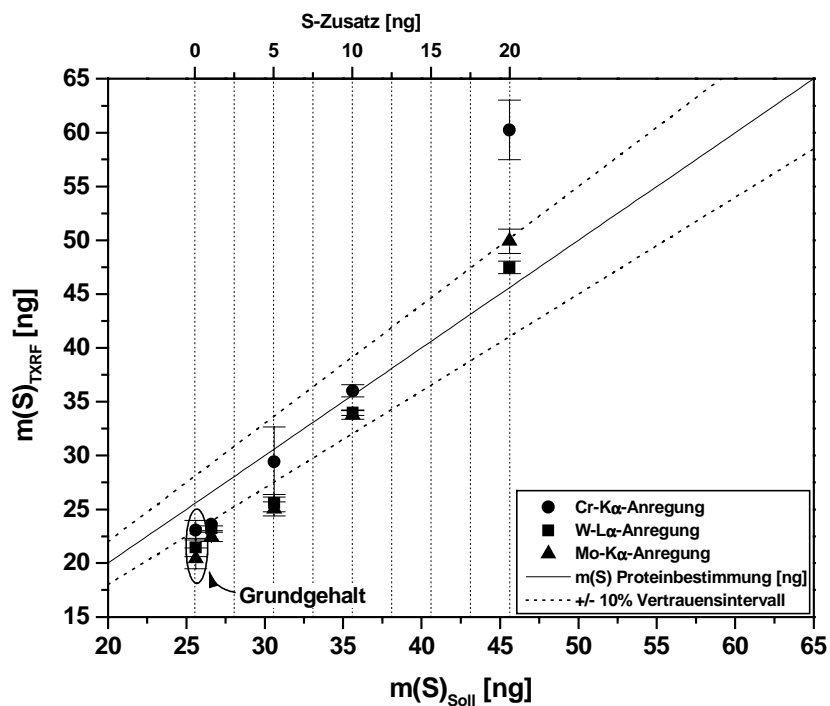


Abb. 8.7: Normierung der Schwefel-Wiederfindungen aus Abb. 8.6 mit den aus der biochemischen Proteinbestimmung zu erwartenden Schwefelgehalten.

Hierbei zeigt sich, dass der mit Cr-K α -Anregung bestimmte Grundgehalt um 10 % unter dem aus der biochemischen Proteinbestimmung zu erwartenden Schwefelgehalt (25,6 ng S) liegt. Der mit dem Extra II A-Spektrometer unter W-L α - und Mo-K α -Anregung bestimmte Grundgehalt wird im Vergleich dazu um 15 - 20 % zu niedrig bestimmt.

8.2.2 Topologische Untersuchungen

Die Trocknungsrückstände auf den beiden Probenträgermaterialien PMMA und Quarz wurden auch hier wieder mittels *ALPHA*-Step charakterisiert. In Abb. 8.8 sind die erhaltenen Höhenprofile der Probenrückstände des reinen Enzyms und nach den einzelnen Zugaben der Additionslösungen dargestellt. Im Gegensatz zur Versuchreihe in wässriger Matrix erfolgte hier bei beiden Probenträgermaterialien eine Trocknung der Enzymproben an Luft bei Raumtemperatur (vgl. Kap. V). Nach der Trocknung kommt es zur Ausbildung von vergleichbaren Probenrückstandsprofilen, wobei auf den PMMA-Trägern insgesamt betrachtet etwas geringere Schichtdicken ausgebildet werden. Die Randbildung ist auf den Quarz-Probenträgern durch den Zusatz der schwefelhaltigen Aufstocklösungen ausgeprägter als im Vergleich mit den PMMA-Trägern. Dies kann im Fall der Quarz-Träger eventuell eine stärkere Abschattung des Primärstrahls bewirken. Insgesamt betrachtet weisen die nach der Lufttrocknung verbliebenen Rückstände auf beiden Probenträgermaterialien weniger dicke Rückstände als in Abb. 8.4 links (Trocknungsrückstände von wässrigen Al₂(SO₄)₃-Lösungen) bei gleicher Trocknungsmethodik auf.

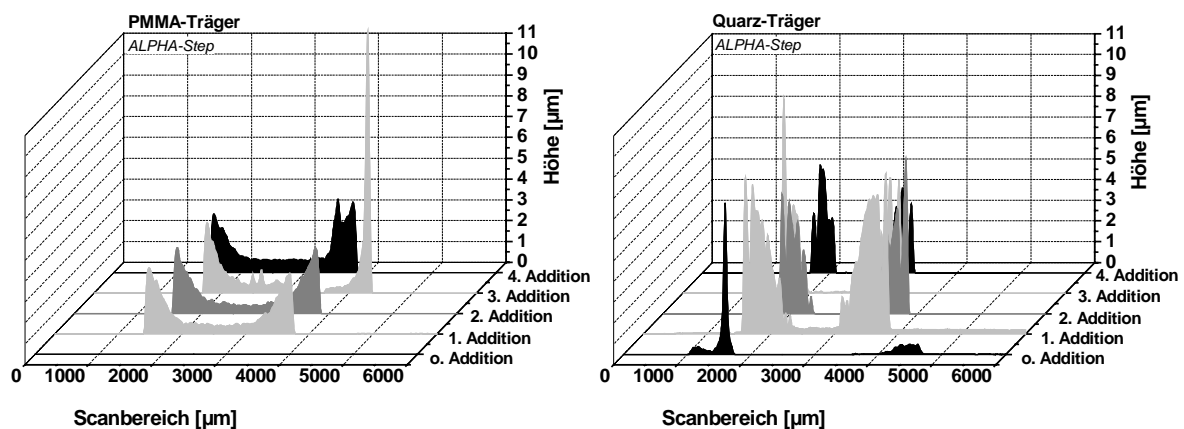


Abb. 8.8: *Alpha*-Step Höhenprofile der Trocknungsrückstände von DFPase vor und nach Zugabe definierter schwefelhaltiger Aufstocklösungen; links: Trocknungsrückstände auf PMMA-Trägern; rechts: Trocknungsrückstände auf Quarz-Trägern; bei allen Proben erfolgte eine Lufttrocknung bei Raumtemperatur.

8.2.3 Winkelabhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten und horizontale Positionierung (y-Scan)

Der Probentisch des GeMeTec-Spektrometers weist im Gegensatz zum TXRF-Spektrometer Extra II A fünf Freiheitsgrade auf, die durch Motoren schrittweise variiert werden können: Höhe z , linear horizontale Verschiebungen x und y , Azimutwinkel ϕ und Neigungswinkel χ . Variationen in der Höhe z beeinflussen den Auftreffpunkt des Röntgenstrahls auf der Probe. Die Höheneinstellung erfolgt anhand des Maximums an Fluoreszenzintensität

(Cr-K α). Durch Kombination der Parameter x , y und ϕ kann jeder beliebige Punkt auf dem Probenstück angesteuert werden. Der Neigungswinkel χ definiert schließlich den Winkel ϕ (Einfallswinkel) zwischen dem Primärstrahl und der Probenoberfläche.

Aufgrund der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten vom Einfallswinkel ϕ bzw. des Neigungswinkels χ lassen sich Aussagen über Probencharakteristiken (partikel- bzw. filmartig) treffen (vgl. Kap. II, Abb. 2.3). Wichtig für das Prinzip der Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse ist weiterhin die Positionierung des Probenträgers. Zum einen muss der Einfallswinkel der primären Röntgenstrahlung auf dem Probenträger unterhalb des kritischen Winkels der Totalreflexion bleiben. Zum anderen muss die Probe exakt im Bereich der primären Röntgenstrahlung und unter dem Eintrittsfenster des Detektors ausgerichtet werden. Die primäre Röntgenstrahlung trifft auf dem Probenträger nicht mit konstant verteilter Intensität auf, sondern besitzt in der Mitte einen maximalen Bereich, der zu den Rändern hin abnimmt. Bei vollständiger und optimaler Anregung der Probe erreicht die induzierte Fluoreszenzstrahlungsintensität ein Maximum. Das Eintrittsfenster des verwendeten Detektors im GeMeTec-Spektrometer hat eine Fläche von nur 2 mm². Die wirksame Detektoroberfläche des Extra II A-Spektrometers beträgt hingegen 80 mm². Die zu untersuchenden Proben haben in der Regel Durchmesser von 2 – 5 mm. Die Positionierung der Proben erfolgt beim PADRAY zur Zeit noch manuell. Durch horizontale Verschiebungen der Probe (y -Scans) sollte gewährleistet werden, dass selbst bei einer nicht optimalen Positionierung der Proben im Messbereich vernünftige Messergebnisse erhalten werden. Desweiteren können mit Hilfe eines y -Scans Aussagen über eine gleichmäßige Verteilung der einzelnen Probenbestandteile und des internen Standards über einen Probenquerschnitt getroffen werden. Gerade dieser Punkt ist bei TXRF-Analysen von größter Wichtigkeit, denn wenn das Intensitätsverhältnis zwischen Probe und Standard konstant ist, sind die Analysen weitgehend unabhängig von der Korngröße bzw. Schichtdicke, und auch vom Einstrahlwinkel ϕ (vgl. Kap. II). Die folgenden Abbildungen 8.9 und 8.10 zeigen die mit Cr-K α -Anregung gemessenen Winkelabhängigkeiten der Fluoreszenzintensitäten, sowie y -Scans der reinen Enzymprobe (E0), nach Zusatz der ersten (E1) und nach Zusatz der vierten Schwefel-Additionslösung (E4) zum Enzym. Es sind jeweils das Streusignal der Cr-K α -Anregung (elastische Streuung) sowie die Schwefel- und Scandium (interner Standard)-Fluoreszenzintensitäten dargestellt. Für das Schwefelsignal erkennt man in Abb. 8.9 einen Verlauf der Winkelabhängigkeit von näherungsweise Filmcharakter (im reinen Enzym E0) bis hin zu hauptsächlichem Partikelcharakter (E4). Das Schwefelsignal hat im reinen Enzym ein Maximum der Fluoreszenzintensität am kritischen Winkel, was für eine dünne Schicht (Film) und/oder kleine Partikel charakteristisch ist. Aufgrund der Dicke des hier ausgebildeten Films kommt es allerdings zu einer Verschiebung des Maximums zum kritischen Winkel der Schicht hin. In Abb. 8.9 c scheint sich hingegen im Winkelscan die

typische Plateauausbildung bei Winkeln unterhalb des kritischen Winkels mit einem Abfall der Fluoreszenzintensität am kritischen Winkel anzudeuten (vgl. auch Abb. 2.3, Kap. II). Da für die Aufstocklösungen ein anorganischer Sulfat-Standard ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) verwendet wurde, ist dieser Kurvenverlauf aufgrund der immer größer werdenden Anteile an anorganischem Salz zu erwarten.

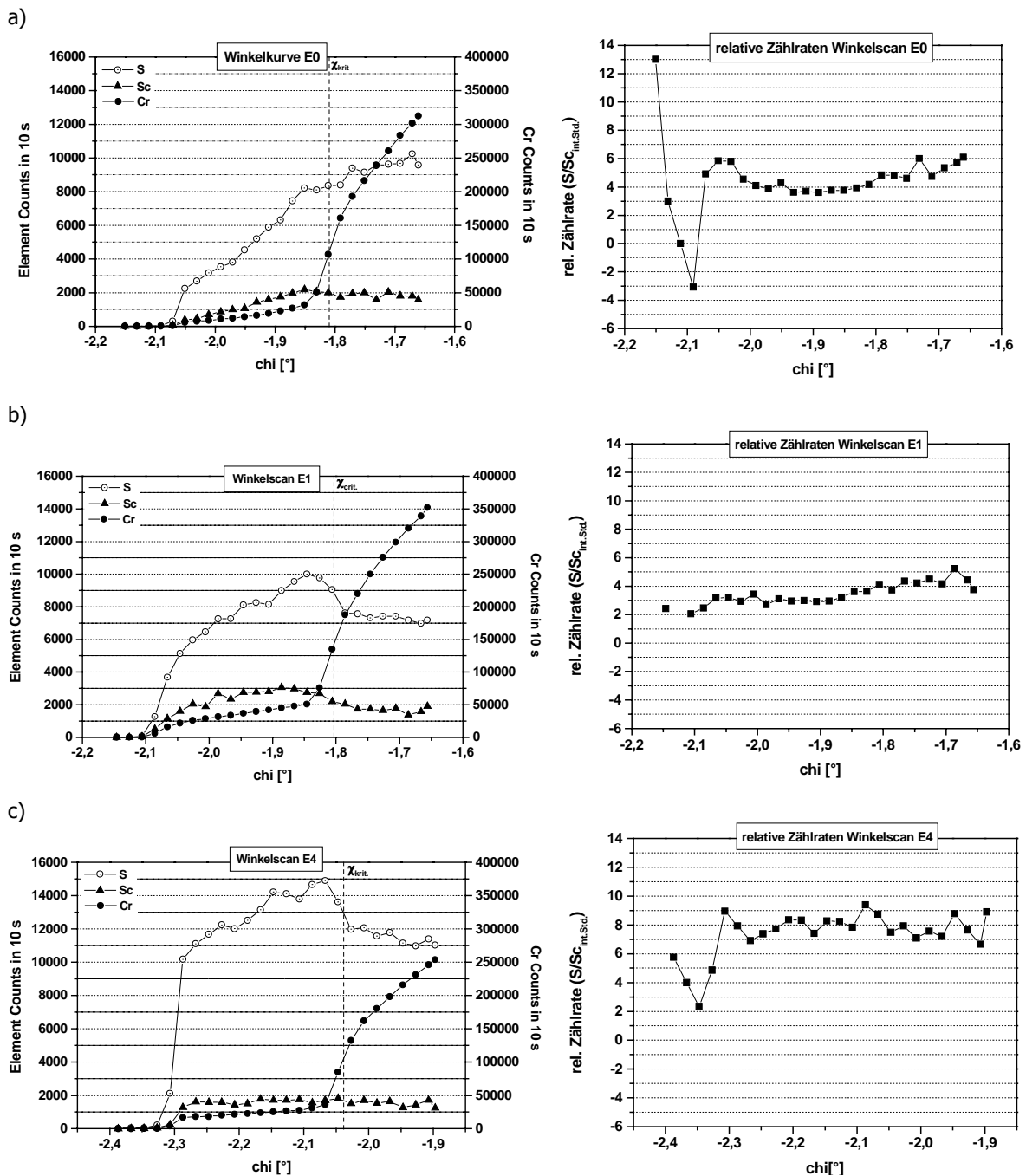
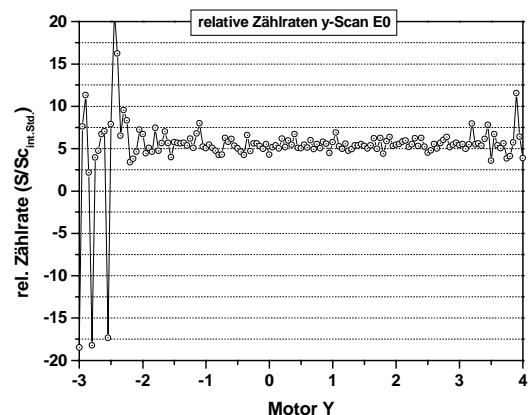
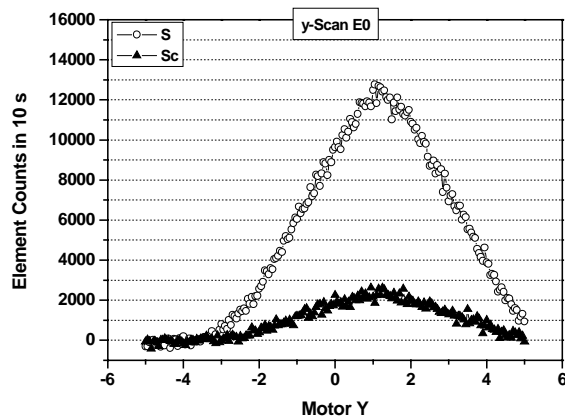


Abb. 8.9 a-c: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Neigungswinkel (Winkelscan) a) der reinen Enzymprobe (E0), b) nach Zusatz der ersten (E1) und c) nach Zusatz der vierten (E4) schwefelhaltigen Additionslösung zum Enzym. Das jeweils gebildete Zählratenverhältnis $S:Sc_{Int.Std.}$ gibt Hinweise auf die Homogenität zwischen Probe und internem Standard (int. Std.).

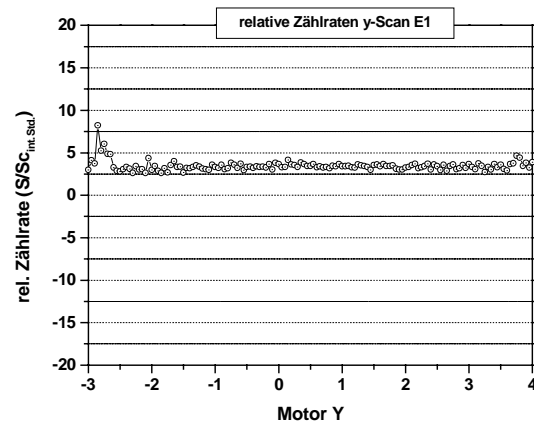
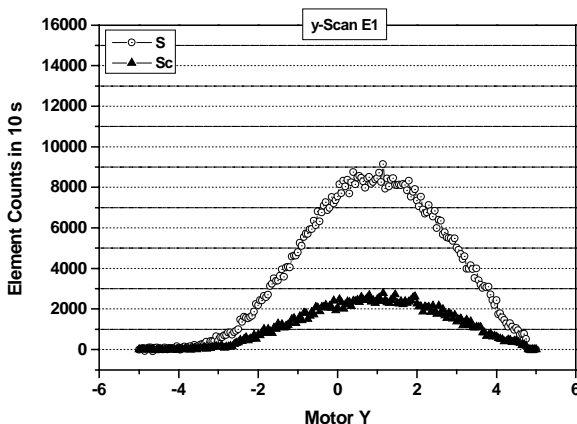
Aus den gemessenen Winkelabhängigkeiten der Fluoreszenzintensitäten wurden anschließend die Elementverhältnisse $S:Sc_{(\text{int. Standard})}$ gebildet und ebenfalls in Abb. 8.9 gegen den Neigungswinkel aufgetragen. Im Bereich des kritischen Winkels zeigen sich in den ersten beiden Fällen (E0 und E1) Intensitätsverhältnisse relativ unabhängig vom Neigungswinkel bzw. Einfallswinkel. Eine etwas höhere Schwankungsbreite ist bei der Probe E4 zu beobachten. Dennoch zeigt die relative Winkel-Unabhängigkeit die homogene Verteilung der beiden Elemente in den Probenrückständen. Die bei flacheren Winkeln in allen drei Proben zum Teil auftretenden größeren Schwankungen rühren von den dort geringeren Zählraten und der damit verbundenen schlechteren Statistik her.

Ebenfalls aufgenommene y -Scans sollten die Homogenität zwischen Probenelementen und internem Standard über den Probenquerschnitt aufzeigen. Wie aus den in Abb. 8.10 a-c dargestellten Scans der drei untersuchten Proben E0, E1 und E4 und den daraus gebildeten Elementverhältnissen $S:Sc_{(\text{int. Std})}$ entnommen werden kann, zeigt sich auch hier eine gute Homogenität mit einer größeren Schwankungsbreite bei Probe E4.

a)



b)



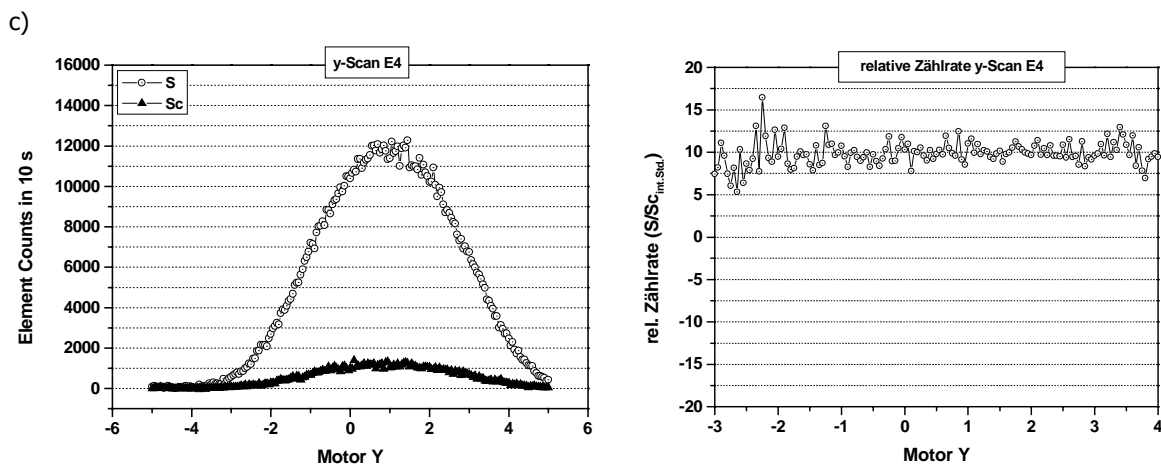


Abb. 8.10 a-c: Fluoreszenzintensitätsverlauf über den Probenquerschnitt (y-Scan) a) der reinen Enzymprobe (E0, b) nach Zusatz der ersten (E1) und c) nach Zusatz der vierten (E4) schwefelhaltigen Additionslösung zum Enzym. Das jeweils gebildete Zählratenverhältnis $S:Sc_{\text{Int.Std.}}$ gibt Hinweise auf die Homogenität zwischen Probe und internem Standard (int. Std.).

ZUSAMMENFASSUNG

In diesem Kapitel wurde ein Vergleich zwischen den drei Anregungsmodi Cr-K α (5,4 keV), W-L α (8,4 keV) und Mo-K α (17,4 keV) zur Bestimmung Elementes Schwefel vorgenommen. In Abhängigkeit von der Photonenenergie des verwendeten Anodenmaterials zur Lage der Absorptionskante der S-K-Linie (2,3 keV) sollte die Anregung mit Cr-K α eine Verbesserung der Schwefelbestimmung bedingen. In den beiden durchgeführten Versuchsreihen, in einer rein wässrigen Matrix und in einer Enzymmatrix, konnte dies allerdings nicht beobachtet werden. Bei Verwendung der Cr-K α -Anregungsstrahlung zeigten sich über den untersuchten Konzentrationsbereich der rein wässrigen Matrix Minderbefunde von 20 – 30 %. Diese ließen sich aber aufgrund massiver Trocknungsrückstände (Reste eingelagerten Wassers) erklären. Eine Verbesserung der Nachweisgrenzen im Vergleich zu den beiden anderen Anregungsmodi konnte aus diesem Grund nicht festgestellt werden. Eine Wiederholung dieser Versuchsreihe unter geeigneteren Trocknungsbedingungen war aus Zeitmangel nicht mehr möglich. Die Versuchsreihe in der Enzymmatrix zeigte vergleichbare Wiederfindungen zwischen den drei untersuchten Anregungsmodi. Gebildete Intensitätsverhältnisse zwischen Schwefel und dem internen Standard Scandium aus Winkelscans und dem Fluoreszenzintensitätsverlauf über den Probenquerschnitt bezeugen eine gute Homogenität der Analyten in den untersuchten Proben.

KAPITEL IX

Diskussion

9.1 Relative Empfindlichkeitsfaktoren

Eine Diskussion dieses für die Quantifizierung der Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse überaus wichtigen Punktes erfolgte bereits in Kapitel 4.3 und soll hier nochmals zusammengefasst werden. Die relativen Empfindlichkeitsfaktoren vernachlässigen die zum Teil erhebliche Absorption der Emissionslinien durch andere Elemente, sowie durch hohe Matrixanteile. Diese Effekte treten vorrangig bei den leichten Elementen auf. Die relativen Empfindlichkeitsfaktoren sind auf wässrige Matrices idealisierte Faktoren, die nur den unterschiedlichen Empfindlichkeiten der Emissionslinien der einzelnen Elemente Rechnung tragen. Sie berücksichtigen nicht die auf unterschiedlichste Weise und Stärke auftretenden Absorptionseffekte. Diese Effekte müssen in der nachfolgenden Quantifizierung der zu untersuchenden Probe durch weiterführende Korrekturfaktoren kompensiert werden. Dennoch sollten solche Effekte bei der Erstellung der relativen Empfindlichkeitsfaktoren berücksichtigt und durch die Wahl eines entsprechenden Konzentrationsbereiches minimiert werden.

Die Überprüfung der relativen Empfindlichkeitsfaktoren erbrachte für Elemente mit Ordnungszahlen $Z \geq 19$ (Kalium) sehr gute Übereinstimmungen mit den in der Spektrometer-Software bereits vorinstallierten Faktoren. Für die beiden untersuchten leichteren Elemente Phosphor und Schwefel ließen sich dagegen Abweichungen von $> \pm 10\%$ feststellen. Für Phosphor wurden keine weitergehenden Untersuchungen durchgeführt. Das Augenmerk gilt hier sicherlich Absorptionseffekten, wie es im Folgenden für den Schwefel diskutiert wird. Ein zusätzliches Problem des Phosphors ist die Lage seiner $K\alpha$ -Emissionslinie (P- $K\alpha$ 2,0 keV) in der unmittelbaren Umgebung der Absorptionskante des Siliciums (Si- $K\alpha$ 1,7 keV - Silicium als Hauptbestandteil der verwendeten Quarzglasprobenträger). Die Betrachtung der Matrix- und Konzentrationsabhängigkeit des relativen Empfindlichkeitsfaktors von Schwefel zeigt eine starke Matrixabhängigkeit des Faktors bei höheren Konzentrationen. Hier spielen vorrangig Absorptionseffekte der induzierten Fluoreszenzstrahlung des Schwefels eine entscheidende Rolle. Dies zeigen deutlich die ausgebildeten, unterschiedlich dicken Rückstände der untersuchten Verbindungen $Al_2(SO_4)_3$, $MgSO_4$ und Na_2SO_4 . Trotz vergleichbarer Dichten der Substanzen liegen die Dicken der Rückstände von Na_2SO_4 bei höheren Konzentrationen mit $> 30\ \mu m$ etwa um das sechsfache über den

berechneten maximal zulässigen kritischen Schichtdicken (W-L α -Anregung: $d_{\max} = 2 \mu\text{m}$; Mo-K α -Anregung: $d_{\max} = 6 \mu\text{m}$)

9.2 Evaluation der Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse für die Analyse von Enzymproben

Anhand von ausgewählten Enzymen sollte eine Evaluation der Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse für die Analyse von Enzymproben erfolgen. Dafür wurden drei Enzyme ausgewählt, die aufgrund ihres Molekulargewichtes und ihrer Pufferzusammensetzungen, unterschiedlich hohe Matrixanteile aufweisen. Leider stand von dem verwendeten Enzymmaterial nur sehr wenig Probenvolumen zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde für die vorgestellten Versuchsreihen jedes Mal neues Probenmaterial verwendet. Dadurch lagen zum Teil recht unterschiedliche Konzentrationen vor. Dennoch soll im Folgenden versucht werden, Aussagen über die Möglichkeiten und Grenzen der TXRF bei der Analyse von Enzymproben zu treffen, besonders in Hinblick auf eine simultane Bestimmung des Proteingehaltes.

9.2.1 Trocknungsmethoden

Zunächst wurde im Zuge der Probenvorbereitung nach einer geeigneten Trocknungsmethode der Enzymproben auf dem Probenträger gesucht. Durch unterschiedliche Verfahren bestehen Möglichkeiten von Elementverlusten oder Absorptionseffekten, welche zu Beeinträchtigungen der TXRF-Analysen, insbesondere der des leichten Elementes Schwefel, führen können.

Die in Kapitel V vorgestellten TXRF-Untersuchungen zeigen im Zusammenhang mit den topographischen Ergebnissen von *ALPHA*-Step und Rasterelektronenmikroskop deutlich, dass sowohl für Calcium als auch für die Übergangselemente Eisen und Kupfer Schichtdickeneffekte nur eine untergeordnete Rolle spielen. Selbst Schichtdicken $> 100 \mu\text{m}$, wie sie bei den gefriergetrockneten Proben der Cytochrom *c* Oxidase auftraten, zeigten keinerlei Beeinflussungen in den Elementbestimmungen. Eine Zerstörung der Enzymstruktur und/oder mögliche Entmischungseffekte zwischen den einzelnen Enzymbestandteilen sind für die TXRF-Messung dieser Elemente unerheblich. Die Ausbildung flüchtiger Metallverbindungen ist im Zuge der Probenpräparation nicht zu erwarten. Auf die simultane Bestimmung des Schwefelgehaltes zur Kalkulation der Enzym- bzw. Proteinkonzentration hat die Präparationsmethode dagegen einen Einfluss. Die niederenergetische Fluoreszenzstrahlung des Schwefels wird durch Ausbildung dicker Rückstände nicht unerheblich absorbiert. Flüchtige Schwefel-Verbindungen sollten in der Cytochrom *c* Oxidase aufgrund

des rein kovalent gebundenen Schwefels der Aminosäuren Methionin und Cystein selbst im Zuge einer Denaturierung der Enzymstruktur durch Wärmeeinfluss nicht auftreten. Im Fall des anorganisch gebundenen Schwefels in den Fe-S-Clustern des Komplex I können dagegen solche Verluste möglich sein. Sie sind aber aufgrund von Schichtdickeneffekten und der dadurch bedingten Absorption der Fluoreszenzstrahlung des Schwefels in einer TXRF-Messung nur schwer festzustellen. pH-Wert-Messungen im Komplex I nach Zugabe unterschiedlich saurer Medien, wie sie in Kapitel 6.1.4 durchgeführt wurden, belegen eine ausreichende Pufferkapazität der verwendeten Enzympuffer im Rahmen der durchgeführten allgemeinen Probenpräparationen. Anhand der experimentellen Ergebnisse, die vor allem keinen signifikanten Unterschied zwischen der Probentrocknung an Luft bei Raumtemperatur und der Vakuumtrocknung im Exsikkator bei 4 °C aufwiesen, wurde die erstere der beiden Trocknungsmethoden zur Probenpräparation für die Analyse von Enzymproben ausgewählt.

9.2.2 Evaluation der Schwefel-Bestimmung

In Kapitel 6.1 wurden Konzentrationsreihen mit schwefelhaltigen, anorganischen Standardlösungen in den Enzymen DFPase, Cytochrom *c* Oxidase und Komplex I durchgeführt. Dabei zeigte sich deutlich, dass für die beiden „kleineren“ Enzyme DFPase und Cytochrom *c* Oxidase über den untersuchten Konzentrationsbereich gute bis sehr gute Schwefelwiederfindungen erhalten wurden. Die Wiederfindungen liegen innerhalb eines Toleranzbereiches von $\pm 10\%$ mit sehr geringen relativen Standardabweichungen. Für den Komplex I ließ sich ein solches Ergebnis nicht erhalten. Mit zunehmender Schwefelkonzentration innerhalb der Konzentrationsreihe wurden starke Minderbefunde mittels TXRF detektiert. Welche Effekte bzw. welche Faktoren sind für diese Ergebnisse verantwortlich zu machen?

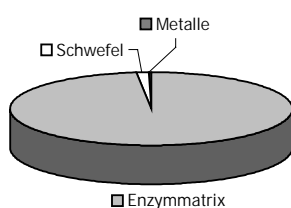


Abb. 9.1: Gewichtsanteile der verschiedenen Matrixkomponenten am Beispiel der Cytochrom *c* Oxidase (*P. denitrificans*).

Bei den Matrixeffekten sind die Einflüsse der bio-organischen Matrix auf der einen und die Pufferkomponenten auf der anderen Seite zu beachten. Den Hauptmatrixanteil stellen dabei die Pufferlösungen, in denen sich die Enzymlösungen befinden (Abb. 9.1). Die DFPase ist das Enzym mit dem kleinsten Molekulargewicht (M_r : 35.079 Da) und dem geringsten Anteil an Pufferkomponenten (2 mM Tris/Acetat-Puffer). Durch die geringen Matrixanteile kommt es nach dem Trocknungsprozess zur Ausbildung von nur sehr geringen und relativ gleichmäßigen Probenrückständen. Die Cytochrom *c* Oxidase weist mit einem Molekulargewicht von $M_r = 126.330$ Da einen nur etwas höheren bio-organischen Matrixanteil auf. Der Anteil an Pufferkomponenten ist im Vergleich zur DFPase allerdings

geringer und relativ gleichmäßigen Probenrückständen. Die Cytochrom *c* Oxidase weist mit einem Molekulargewicht von $M_r = 126.330$ Da einen nur etwas höheren bio-organischen Matrixanteil auf. Der Anteil an Pufferkomponenten ist im Vergleich zur DFPase allerdings

deutlich höher (50 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, 0,2 % Dodecylmaltosid). Demzufolge kommt es auch hier zur Ausbildung dickerer Trocknungsrückstände. Dennoch werden, wie oben bereits beschrieben, gute Schwefel-Wiederfindungen innerhalb der Konzentrationsreihe dokumentiert. Deutliche Einschränkungen in der Schwefel-Bestimmung traten erst im Komplex I auf. Der Anteil der bio-organischen Matrix im Komplex I (M_r : 996.000 Da) beträgt etwa das 27-fache dessen der DFPase bzw. das 7-fache dessen der Cytochrom *c* Oxidase. Der Anteil der Pufferkomponenten ist allerdings vergleichbar mit denen der Cytochrom *c* Oxidase. Letzteres sollte also allein von der rein organischen Matrixbetrachtung auch auf eine ähnliche Wiederfindung schließen lassen. In Tab. 9.1 sind die aus den Enzymkonzentrationen resultierenden absoluten Probenmengen auf dem Quarzglasprobenträger aufgeführt⁽¹⁾. Aufgrund des erheblich höheren Molekulargewichtes des Komplex I wird trotz einer zehnfach geringeren Enzymkonzentration im Vergleich zur Cytochrom *c* Oxidase eine vergleichbare absolute Proteinmasse auf den Probenträger aufgebracht. Dies und die ähnlichen Pufferzusammensetzungen könnten auch die vergleichbaren Rückstandsprofile der beiden Enzyme erklären, wie sie in Kap. VI in den Abb. 6.5 und 6.7 (jeweils Höhenprofilaufnahmen „ohne Addition“) vorgestellt wurden. Zusätzlich wurden in die Tab. 9.1 die mit dem Enzym auf den Probenträger aufbrachten Schwefelmengen aufgenommen. Hier zeigt sich im Vergleich zwischen Cytochrom *c* Oxidase und Komplex I die gleiche absolute Menge an Schwefel, während mit der DFPase bei den vorliegenden Konzentrationen eine 20-fach geringere Schwefelmenge aufgebracht wird. Die Elementmengen liegen – in Abhängigkeit von der verwendeten Anregungsstrahlung – um ein bis zwei Größenordnungen über den ermittelten Nachweisgrenzen für Schwefel (siehe Abschnitt 9.2.6).

Enzym	M_r [kDa]	Anzahl S [mol/mol Enzym]	Protein- konz. [μ M]	Protein- konz. [mg/ml]	Enzym- menge absolut [μ g]	Menge S absolut [μ g]	S:Enzym
DFPase	35	16	13	0,456	1,8	0,02	0,011:1
COX	126	54	79	10	40	0,4	0,010:1
Komplex I	996	vermutlich 450	7,8	7,4	30	0,4	0,013:1

Tab. 9.1

In der letzten Spalte von Tab. 9.1 wurden die Daten auf ein Schwefel:Enzymverhältnis normiert, welches das Verhältnis der molaren Matrixanteile, die auf 1 mol Schwefel kom-

¹ nicht berücksichtigt sind zusätzliche Matrixanteile durch die Pufferkomponenten

men, verdeutlichen soll. Man erkennt, dass in allen drei Enzymen die Verhältnisse der Enzymmatrixanteile zum Schwefel keine großen Unterschiede aufweisen (auch hier wurden die Anteile der Pufferkomponenten nicht berücksichtigt). Für die Minderbefunde bei der Schwefelbestimmung im Verlauf der Konzentrationsreihe des Komplex I könnten theoretisch, aufgrund der angeführten Überlegungen, zwei Faktoren verantwortlich gemacht werden. Die Wiederfindungsraten im Komplex I nehmen mit steigender Additionsmenge ab (Kap. VI, Abb. 6.6). In den Höhenprofilaufnahmen ändert sich nach der ersten Additionszugabe die Form des Rückstandes (Abb. 6.7, „1. Addition“). Er wird deutlich voluminöser und absorbiert dadurch Teile der niederenergetischen Fluoreszenzstrahlung des Schwefels. Selbstabsorptionseffekte spielen dagegen aufgrund der anteilsmäßig geringen Schwefelmengen keine Rolle. Durch die vorgenommenen Schwefeladditionen wird der Schwefelgehalt um maximal 30 % gesteigert. Absolut sind die Schwefelmengen auch hier im Vergleich zur Gesamtmatrix immer noch gering.

Absorptionseffekte im reinen Enzym finden noch nicht statt. Hier scheinen die Schichtdicken der Trocknungsrückstände an der Grenze zu liegen (vgl. 9.2.5). Dies zeigt auch Abb. 9.2, in der die Konzentrationsreihen aus Kap. VI auf den aus der biochemischen Proteinbestimmung berechenbaren Schwefelgehalt normiert wurden, exemplarisch für den Komplex I im Vergleich zur DFPase. Die mit TXRF bestimmten Ausgangsgehalte an Schwefel stimmen für beide Enzyme gut mit dem aus der biochemischen Proteinbestimmung berechenbaren Schwefelgehalt überein. Allein in der DFPase wird mittels W-L α -Anregung eine um etwa 10 % niedrigere Schwefelkonzentration bestimmt.

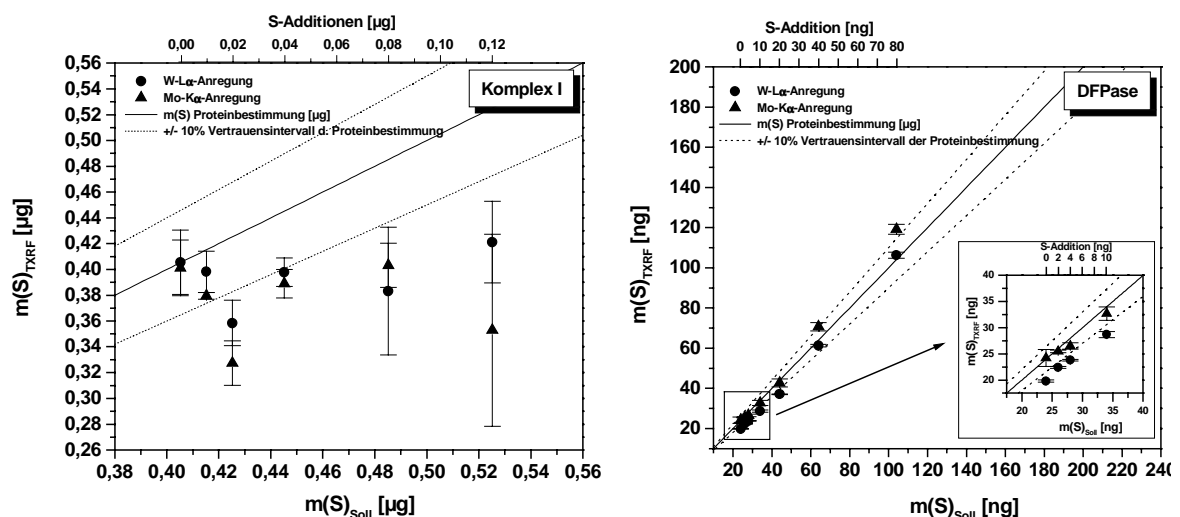


Abb. 9.2: Normierung der Konzentrationsreihen ausgehend von dem aus der biochemischen Proteinbestimmung berechenbaren Schwefelgehalt für Komplex I (links) und DFPase (rechts). Proteinkonzentration Komplex I: 7,4 mg/ml (7,8 μ M), Proteinkonzentration DFPase: 0,46 mg/ml (13 μ M).

Theoretisch ließen sich Korrekturen für die Schichtdicken bedingte Absorption durchführen, indem man Eichreihen mit einer Reihe von Proben bekannter Dicke herstellt. Aus der Differenz zwischen der gemessenen Fluoreszenzintensität ohne und mit Absorption wäre dann ein Korrekturfaktor bestimmbar. Eine solche Vorgehensweise ist allerdings mit den vorliegenden Proben nicht durchführbar, da Präparate definierter Dicke nicht herstellbar waren.

Aufgrund der festgestellten Beobachtungen muss bei allen auch zukünftig zu untersuchenden Enzymen die Zuverlässigkeit der TXRF-Messungen aufgrund der unterschiedlichen Struktur und Verhaltens jedes Enzyms bestimmt werden. Sie ist abhängig von der Zusammensetzung, den Eigenschaften und topologischen Beschaffenheiten der Trocknungsrückstände. Infolge der Ausbildung von stehenden Wellen (Kap. II) muss die Probe eine Mindestschichtdicke von 100 nm aufweisen. Die Intensität wird über ihre vertikale Ausdehnung integriert, so dass uneinheitliche oder asymmetrische Rückstände die Präzision, gerade bei der Bestimmung der niederenergetischen Elemente, verschlechtern können. In Abb. 9.3 ist dies bei zwei extremen Beispielen der Cytochrom *c* Oxidase und des Komplex I anhand von azimuthalen Winkelvariationen der Probenträger dokumentiert. Versuche der Kompensation solcher topologischer Effekte durch Zusatz grenzflächenaktiver Stoffe, wie es in Kap. VII versucht wurde, brachten nicht den gewünschten Effekt. Die Höhenprofilaufnahmen der Trocknungsrückstände zeigten keine erkennbaren Verbesserungen der asymmetrischen Rückstände, vor allem der ausgeprägten Randbildung.

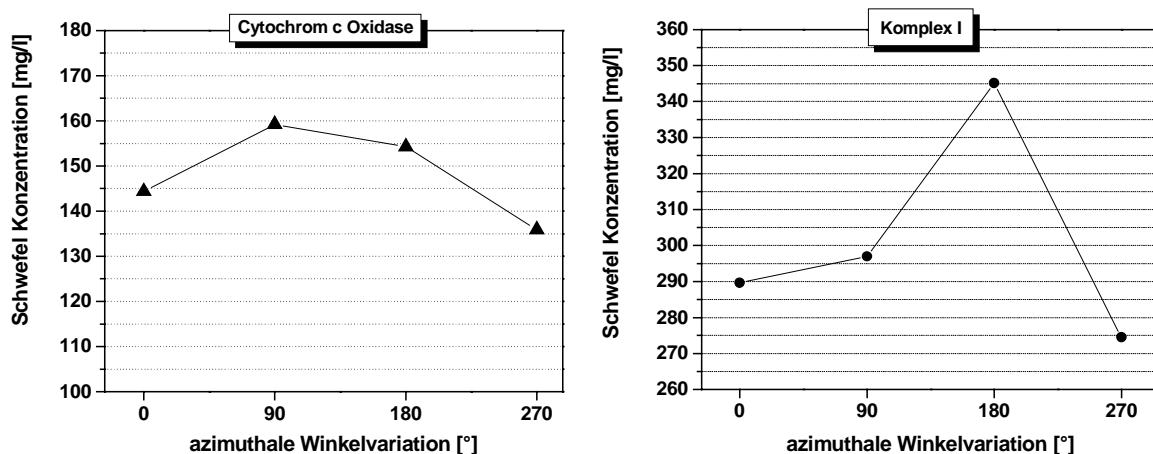


Abb. 9.3: Auswirkungen asymmetrischer Rückstände auf die Schwefel Bestimmung: Azimutale Winkelvariationen der Probenträger mit Proben von Cytochrom *c* Oxidase (links) und Komplex I (rechts); Mo-K α -Anregung.

Die Erhöhung der Anregungseffizienz durch Verwendung einer Cr-K α -Strahlung sowie die Reduzierung der Luftabsorption durch Verwendung einer Vakuumkammer zeigten keine

deutlichen Verbesserungen in der Schwefelbestimmung. Die Schwefelbestimmung in einer wässrigen Matrix ($\text{Al}_2\text{SO}_4)_3$) wies Minderbefunde durch Absorption aufgrund dicker Trocknungsrückstände auf. Die ausgebildeten Schichtdicken, hervorgerufen durch eine unzureichende Entfernung des Lösungsmittels, lagen über der für diese Matrix und Anregungsstrahlung zulässigen kritischen Schichtdicke d_{max} von $1 \mu\text{m}$. Die mit Cr-K α -Anregung nach der durchgeführten Konzentrationsreihe erreichbaren Schwefelwiederfindungen in einer kleinen Enzymmatrix (DFPase) sind dagegen sehr gut. Allerdings zeigten die beiden anderen Anregungsmodi (W-L α und Mo-K α) vergleichbare Wiederfindungen. Ein Vorteil des GeMeTec-Spektrometers ist seine Möglichkeit zu winkelabhängigen Messungen und zu Messungen über den Probenquerschnitt. Durch Bildung von Zählratenverhältnissen zwischen Analyt und internen Standard können so Aussagen über ihre gleichmäßige (homogene) Verteilung in der Probe getroffen werden. Eine homogene Verteilung zwischen internem Standard und Analyt-Elementen ist einer der entscheidenden Punkte bei TXRF-Analysen, da lokale Anreicherungen von bestimmten Elementen in der Probe zu systematischen Fehlern führen. Solche Aussagen sind mit konventionellen Spektrometern der älteren Generation zur Spurenanalyse nicht möglich. Die Ergebnisse der Winkel- und horizontalen Abhängigkeiten der Fluoreszenzintensitäten zeigen deutlich, dass diese Voraussetzungen in den untersuchten Proben weitgehend gegeben sind.

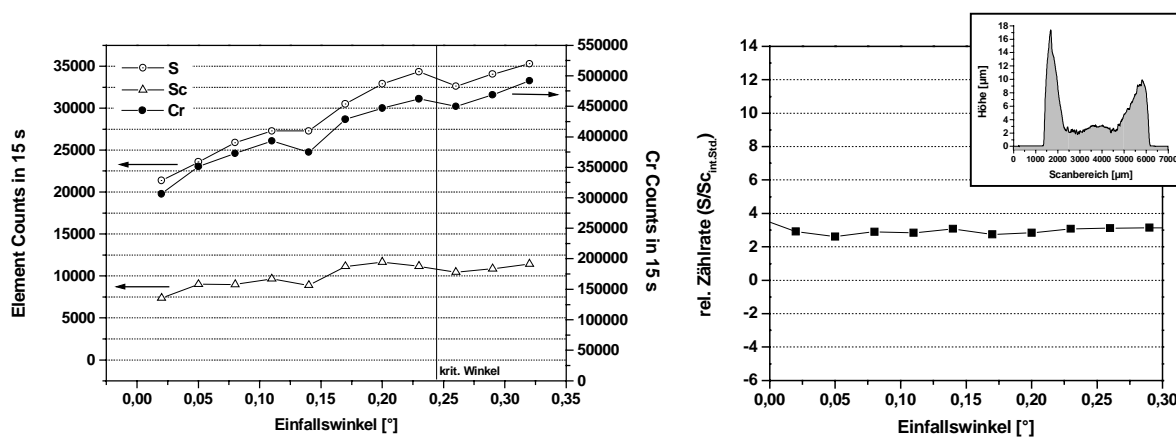


Abb.9.4: Winkelkurven (links) und relative Elementzählraten (rechts) für den Komplex I (Cr-K α -Anregung), sowie ALPHA-Step-Höhenprofilaufnahme des Trocknungsrückstandes auf PMMA-Träger.

Auch bei Enzymen mit deutlich höheren Matrixanteilen, wie dem Komplex I, zeigen die Winkelkurven und relativen Elementzählraten, dass eine weitgehend homogene Verteilung zwischen Analyten und internem Standard auch hier noch gegeben sind (Abb. 9.4). Allerdings ist aufgrund der dickeren Rückstandsbildung kein kritischer Winkel mehr in der Winkelkurve erkennbar. Die Schwefel-Wiederfindungen zeigten an dieser Probe auch im Vergleich zur W-L α - und Mo-K α -Anregung deutliche Minderbefunde.

9.2.3 Vergleich der Proteinbestimmungen mittels TXRF und biochemischen Verfahren

In Abb. 9.5 sind die mittels TXRF erhaltenen Proteingehalte im Vergleich zu den Proteingehalten nach biochemischen Proteinbestimmungsmethoden dargestellt. Dazu wurde über die verfügbaren Proben gemittelt und anschließend die mittels TXRF und biochemischen Verfahren erhaltenen Proteinkonzentrationen⁽²⁾ ins Verhältnis gesetzt. Da in der Regel die mit W-L α - und Mo-K α -Anregung bestimmten Schwefelkonzentrationen differierten, wurde auch in Abb. 9.5 zwischen den beiden Anregungsmodi unterschieden.

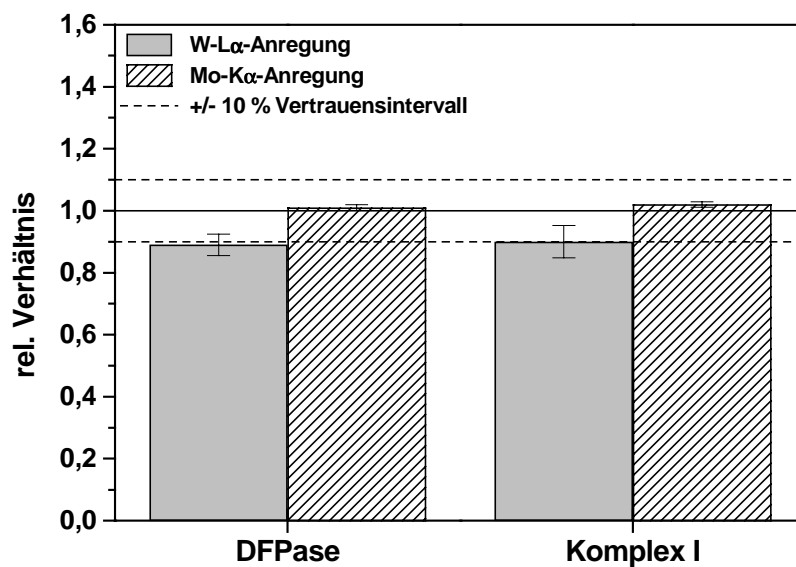


Abb. 9.5: Verhältnis zwischen mit TXRF und nach biochemischen Verfahren bestimmten Proteingehalten für DFPase und Komplex I in Abhängigkeit von der Anregungsstrahlung; dargestellt ist der Quotient von TXRF:biochemischen Verfahren.

Interessanterweise zeigt die unter Mo-K α -Anregung erhaltene Proteinkonzentration in beiden Enzymen eine fast genau 100 %ige Übereinstimmung mit dem „biochemischen Proteingehalt“. Dabei liegt hier der Schwefel an der untersten Grenze des mit dieser Anregung noch gut detektierbaren Elementbereichs. Mit der W-L α -Anregung sollte aufgrund der besseren Anregungseffizienz eine bessere Bestimmung des Schwefels möglich sein. Der erhaltene Proteingehalt liegt hier in beiden Enzymen jedoch etwa 10 % unter der mit Mo-K α -Anregung ermittelbaren Proteinkonzentration bzw. unter dem der biochemischen Proteinbestimmungsmethoden. Ein Erklärungsansatz für die Unterschiede in den beiden Anregungsmodi könnte zum einen in der spektrometerspezifischen Kalibrierung liegen. Dieser Punkt wurde in Kapitel IV mit der Neubestimmung der relativen Empfindlichkeits-

² DFPase: Proteinbestimmung über UV-Absorptionsspektroskopie [59, 60]; Komplex I: Proteinbestimmung nach Lowry [22, 24]

faktoren überprüft. Für beide Anregungen wurden auch Unterschiede zu den vorhandenen Faktoren festgestellt. Eine entsprechende Änderung der Faktoren brachte aber in der Praxis nicht den erhofften Erfolg. Die Differenz zwischen den beiden Anregungsmodi blieb bestehen. Ein alternativer Erklärungsansatz liegt in den Trocknungsrückständen (Schichtdicken) und den resultierenden Nachweisgrenzen. Durch die feste, geometrische Anordnung der beiden Röntgenröhren im TXRF-Spektrometer – beide stehen in einem 90° Winkel zueinander – können asymmetrische Rückstände Auswirkungen auf die Schwefelbestimmung im Vergleich zwischen den beiden Anregungsmodi haben. Schon die Ergebnisse der azimuthalen Winkelvariationen eines Probenträgers in Abb. 9.3 zeigte dies bei alleiniger Mo-K α -Anregung. In einigen Fällen war eine Angleichung der erhaltenen Messergebnisse bei W-L α - und Mo-K α -Anregung zu beobachten, wenn der Probenträger in Richtung des jeweiligen Strahlenganges gedreht wurde. Für Routinemessungen ist dies allerdings eine zeitaufwendige und nicht zu realisierende Prozedur. Dennoch lassen sich durch diese Beobachtung Anregungseffekte der unterschiedlichen Anregungsintensitäten ausschließen. Die Anregung bei Verwendung der K α -Strahlung der Mo-Anode weist eine höhere Intensität als bei entsprechender Verwendung der L α -Strahlung der W-Anode auf, allerdings sind für die detektierten Fluoreszenzintensitäten die energetische Lage der verwendeten Anregungsstrahlung zur Absorptionskante des Analyten von größerer Bedeutung. Dies ist in den Spektren auch an einer 7 - 10fach höheren Signalrate des Schwefels unter W-L α -Anregung im Vergleich zur Mo-K α -Anregung festzustellen. In der Regel werden dann auch in leichteren Matrices Analyt und interner Standard gleichermaßen beeinflusst, so dass ihr Zählratenverhältnis und somit die bestimmte Konzentration überwiegend konstant bleibt. Dies konnte für den Analyten Schwefel in der DFPase und Mangan als zugesetzten internen Standard bei Zugabe unterschiedlicher Mengen einer organischen Matrix (hier 0,01 % PVA) gezeigt werden (Abb. 9.7). Vergleicht man allerdings die Zählratenverhältnisse zwischen den beiden Anregungsmodi, so wird eine Differenz von etwa 30 % beobachtet. In etwa derselbe Faktor findet sich auch bei Bildung der relativen Empfindlichkeitsfaktoren-Verhältnisse $(S_S:S_{Mn})_{W-L\alpha\text{-Anregung}}/(S_S:S_{Mn})_{Mo-K\alpha\text{-Anregung}}$ wieder. Da beide Verhältnisse nach Gleichung 2.3 in die Berechnung der Konzentration eingehen, werden die mit beiden Anregungsmoden übereinstimmenden Ergebnisse in diesem Fall erklärbar.

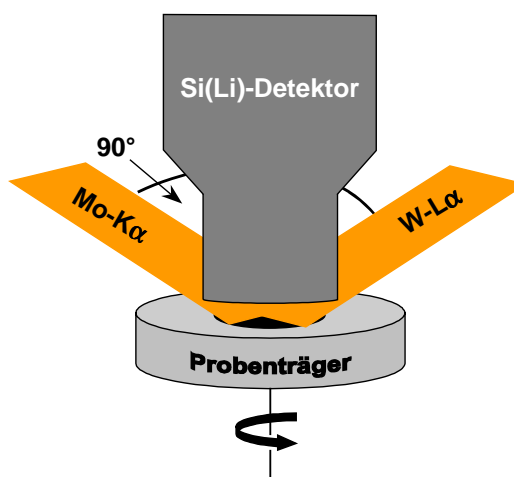


Abb. 9.6: Schematische Darstellung der geometrischen Anordnung der beiden Röntgenröhren (Mo, W) in einem TXRF-Spektrometer Extra IIA.

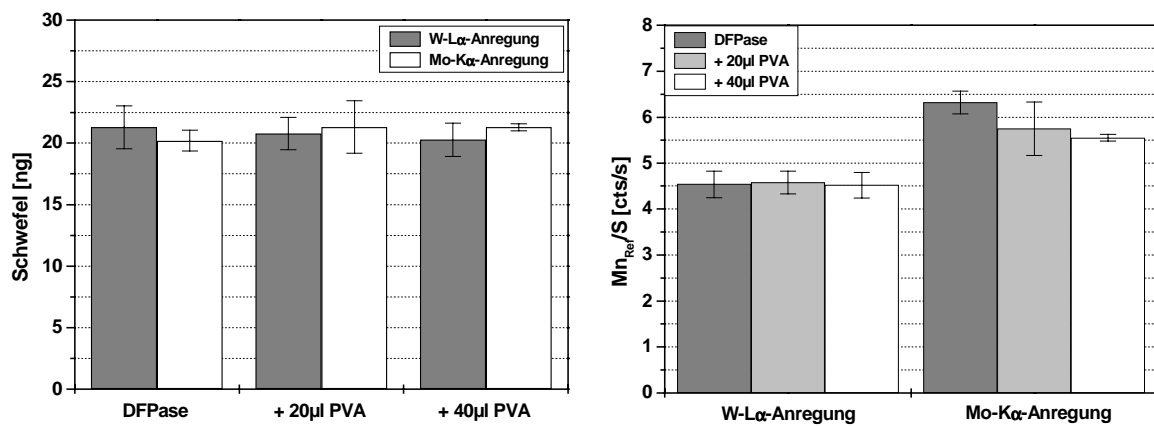


Abb. 9.7: Auswirkungen von Zusätzen unterschiedlicher Mengen einer organischen Matrix (0,01 % PVA) auf die Schwefelkonzentration (links) und das Zählratenverhältnis $Mn_{int. Std.}/S$ (rechts) in Abhängigkeit von der verwendeten Anregungsstrahlung.

Dennoch stellt sich die Frage nach dem „wahren“ Schwefelgehalt bzw. nach dem was eine analytische Methode in diesem Falle zu leisten vermag. Proteine und Enzyme können nicht in vollständig reiner Form isoliert werden. Bei optimistischer Schätzung kann von einem Verunreinigungsgrad von mindestens 5 – 10 % ausgegangen werden. Solche Verunreinigungen wirken sich in der Regel auf die Elementbestimmungen von Schwefel und Eisen aus, seltener auf andere Cofaktoren wie z. B. Kupfer. Auch besteht die Möglichkeit des Verlustes einzelner Aminosäuren oder gar ganzer Enzymuntereinheiten. Die Lowry-Methode beruht auf der spektroskopischen Bestimmung von mittels Biuret-Reaktion und Folins-Reagenz gebildeten gefärbten Komplexsalzverbindungen. Störungen der Farbreaktion können durch verschiedene Puffer-Komponenten oder durch Membran- oder Lipoproteine an sich auftreten. Man kann heute, nachdem diese Methode auch verschiedenen Modifizierungen unterworfen wurde, um diesen Störungen entgegenzuwirken, von etwa 10 % Fehler in der Proteinbestimmung ausgehen. Somit liegen die mittels TXRF bestimmten Proteinkonzentrationen innerhalb des Vertrauensbereiches der biochemischen Methoden. Für die Enzyme DFPase und Cytochrom *c* Oxidase ist diese Schwankungsbreite aufgrund ihrer Cofaktoren:Protein-Verhältnisse für die Elementstöchiometrien genügend. Im Fall des Komplex I dagegen hätte der Fehler in der Schwefelbestimmung auf unter $\pm 5\%$ gesenkt werden müssen, um Schwankungsbreiten in den Fe-Stöchiometrien von $\leq \pm 1$ zu erzielen. Dies ist aber aufgrund der geschilderten Problematiken schwer zu erreichen.

9.2.4 Evaluation der Cofaktoren-Bestimmung

Wie in den Kap. V und VI dargelegt wurde, konnte eine Beeinflussung der Detektion der schwereren Elemente wie Calcium, Eisen oder Kupfer nicht festgestellt werden. Auch der Zusatz einer Multielementstandardlösung (4 ng je Element) zu den Enzymen, wie sie in der Abb. 9.8 für die DFPase und die Cytochrom *c* Oxidase exemplarisch dargestellt sind, zeigten zufriedenstellende Wiederfindungsraten. Die Zuverlässigkeit der TXRF-Messungen durch die Eigenschaften und topologischen Beschaffenheiten der Trocknungsrückstände wurde nicht beeinträchtigt. Auch eine Verschlechterung der Präzision durch uneinheitliche oder asymmetrische Rückstände aufgrund Blasenbildung oder Oberflächenspannungseffekten konnte nicht nachgewiesen werden. Um dies zu überprüfen wurden mit aufgebrauchten Proben der Cytochrom *c* Oxidase und des Komplex I azimutale Winkelvariationen durchgeführt. Der Messpunkt befand sich dabei immer im Mittelpunkt, die Richtung der einfallenden Röntgenstrahlen aber um jeweils 90° variiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 9.9 dargestellt und zeigen eine weitgehend gleichmäßige Verteilung.

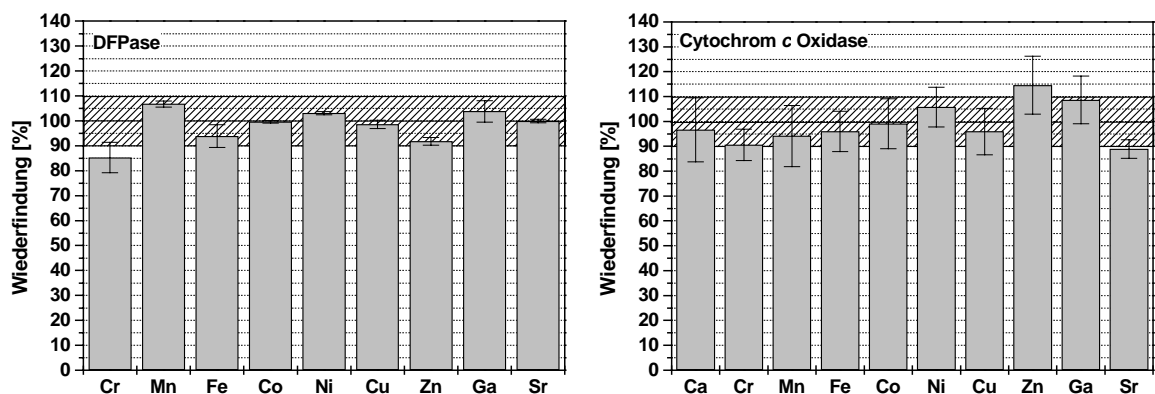


Abb. 9.8: Zusatz eines Multielementstandards (4 ng) zu Proben von DFPase (links) und Cytochrom *c* Oxidase (rechts); Mo-K α -Anregung.

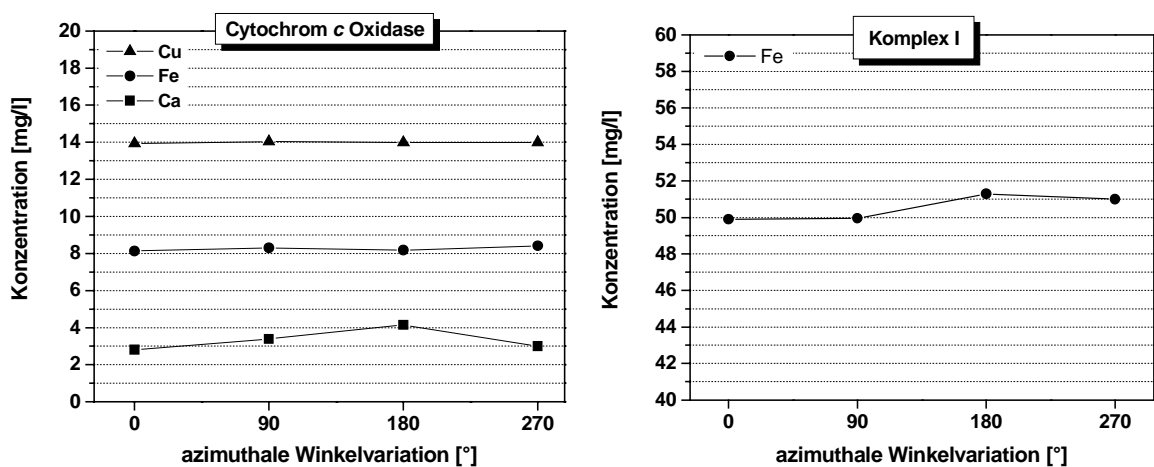


Abb. 9.9: Azimutale Winkelvariationen der Probenträger mit Proben von Cytochrom *c* Oxidase (links) und Komplex I (rechts); Mo-K α -Anregung.

9.2.5 Kritische Schichtdicken

Für die untersuchten Enzymproben wurden nach Gl. 2.5 in Kap. II die kritischen Schichtdicken d_{\max} , bei der noch eine maximal zulässige Absorption von etwa 5% auftritt, berechnet. Die kritischen Schichtdicken wurden in Bezug auf Schwefel kalkuliert, dem niederenergetischsten der interessierenden Elemente. Die Schichtdicke des Eintrockenrückstandes einer Probe auf dem Probenträger wird bedingt durch die Gesamtkonzentration an organischen und anorganischen Komponenten. Da die Pufferkomponenten den Hauptmatrixanteil in den Enzymproben ausmachen, wurde die Dichte (jeweils $\sim 1 \text{ g/cm}^3$) der verwendeten Tris/Acetat-Puffer (DFPase: 2 mM Tris/Acetat; Cytochrom *c* Oxidase, Komplex I: 50 mM Tris/Acetat) zur Berechnung herangezogen. Die daraus resultierenden kritischen Schichtdicken von Probenrückständen im Rahmen von Schwefel-Bestimmungen sind in Tab. 9.2 zusammengestellt. Für eine reine Betrachtung der Cofaktoren-Elemente wie Calcium, Eisen oder Kupfer sind aufgrund ihrer höherenergetischen Fluoreszenzstrahlung dickere Schichtdicken zulässig. Für die Übergangsmetalle können sie bezogen auf Mo-K α -Anregung das Vierfache der für Schwefel berechneten Werte betragen.

	Mo-K α	W-L α	Cr-K α
$d_{\max} \text{ (S)}$	$\sim 20 \text{ }\mu\text{m}$	$\sim 3 \text{ }\mu\text{m}$	$\sim 2 \text{ }\mu\text{m}$

Tab. 9.2: Kalkulierte kritische Schichtdicken in Abhängigkeit von der Anregungsstrahlung für die Bestimmung des Elementes Schwefel in den untersuchten Enzymen.

9.2.6 Erfassungsgrenzen

In Tab. 9.3 und 9.4 sind die Nachweisgrenzen der Elemente für die untersuchten Enzyme zusammengestellt. Die Berechnung der Erfassungsgrenzen erfolgte nach folgendem Ausdruck für die Erfassungs- bzw. Nachweisgrenzen [39]:

$$m_{\min} = 3 \frac{m}{N_{\text{Net}}} \sqrt{2 N_{\text{Back}}} \quad \text{Gl. 9.1}$$

m: Masse; N_{Net} : Nettozählrate; N_{Back} : Untergrundsignal

Da keine Standardproben mit definierten, genau bekannten Konzentrationen verfügbar waren, wurden die Erfassungsgrenzen „empirisch“ mit den gemessenen Elementkonzentrationen der untersuchten Proben bestimmt. Aus den verfügbaren Proben wurden willkürlich mehrere, mit unterschiedlichen Konzentrationen, herausgegriffen. Daraus ergaben

sich für die Enzyme DFPase, Cytochrom *c* Oxidase und Komplex I die in den folgenden Tabellen 9.3 und 9.4 dargestellten Element-Erfassungsgrenzen.

Die Erfassungsgrenzen für Schwefel, dargestellt in Tab. 9.3, weisen in den Enzymmatrices erwartungsgemäß schlechtere Nachweisgrenzen als in rein wässrigen Matrices auf (vgl. in Kap. II, Tab. 2.2 und Abb. 9.8) und sind abhängig von der Größe der bio-organischen Matrix. Diese hat entsprechende Auswirkungen auf die Trocknungsrückstände und weiterführend auf die Nachweisgrenzen.

Element	Enzym	Konzentrationsbereich [mg/ml]	Erfassungsgrenze [ng]	
			W-L α -Anregung	Mo-K α -Anregung
S	DFPase	0,3 – 1,6	0,5	2 - 6
	Cytochrom <i>c</i> Oxidase	17 - 58	3	15 - 30
	Komplex I	7,4 - 9	5	15 - 30

Tab. 9.3: Erfassungsgrenzen für Schwefel.

Die Erfassungsgrenzen für die in den untersuchten Enzymen vorkommenden Cofaktoren Calcium, Eisen und Kupfer liegen erwartungsgemäß um ein bis zwei Zehnerpotenzen unter denen des Elementes Schwefels (Tab. 9.4).

Element	Enzym	Konzentrationsbereich [mg/ml]	Erfassungsgrenze [ng]	
			W-L α -Anregung	Mo-K α -Anregung
Ca	DFPase	0,3 – 1,6	0,07	0,2
	Cytochrom <i>c</i> Oxidase	17 - 58	0,2	2
	Komplex I	7,4 - 9	-- ⁽³⁾	-- ⁽³⁾
Fe, Cu	DFPase	0,3 – 1,6	-- ⁽³⁾	-- ⁽³⁾
	Cytochrom <i>c</i> Oxidase	17 - 58	0,1	0,4
	Komplex I	7,4 - 9	0,2 ⁽⁴⁾	0,4 ⁽⁴⁾

Tab. 9.4: Erfassungsgrenzen für die in den untersuchten Enzymen vorkommenden Cofaktoren Calcium (DFPase, Cytochrom *c* Oxidase), Eisen (Cytochrom *c* Oxidase, Komplex I) und Kupfer (Cytochrom *c* Oxidase).

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Abb. 9.10 mit den gefundenen experimentellen Erfassungsgrenzen von Wittershagen [70] verglichen. Wittershagen bestimmte die Erfas-

³ kein Cofaktor in diesem Enzym

⁴ nur auf Eisen bezogen, Kupfer kommt im Komplex I nicht vor

sungsgrenzen für die Elemente eines Multielementstandards (Absolutmenge 5 ng) in einem reinem Tris/Acetat-Puffersystem (Zusammensetzung: 100 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, 0,2 g/l Dodecylmaltosid, pH = 8,0). Der Vergleich der Erfassungsgrenzen als Funktion der Ordnungszahl erfolgte allein anhand der Mo-K α -Anregung. Er zeigt für Calcium und die beiden Übergangsmetalle Eisen und Kupfer etwas bessere Erfassungsgrenzen für die DFPase, sowie etwas schlechtere für die Cytochrom *c* Oxidase und den Komplex I.

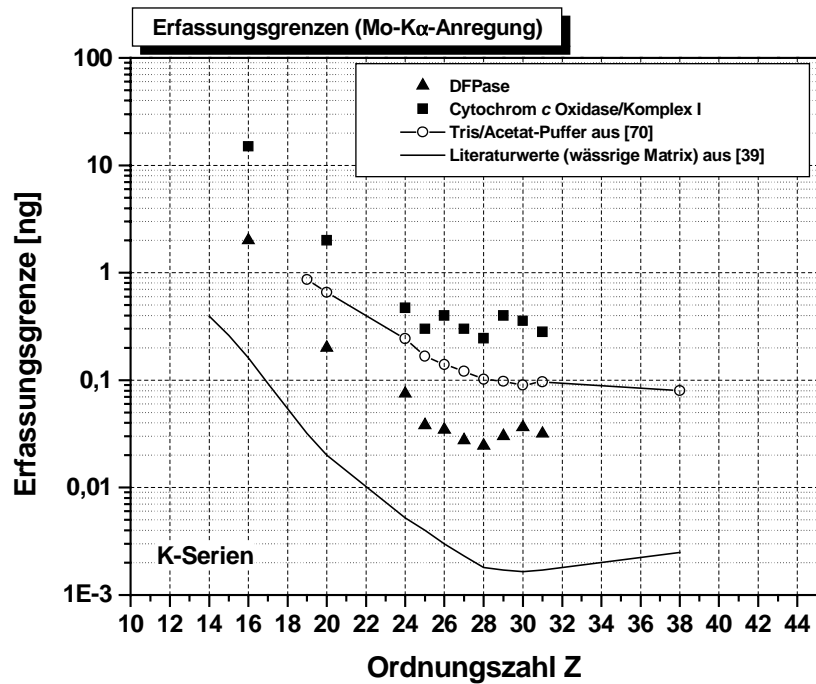


Abb. 9.10: Experimentelle Erfassungsgrenzen in Abhängigkeit von der Ordnungszahl Z in den drei untersuchten Enzymen (Mo-K α -Anregung). Vergleich zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit, den Erfassungsgrenzen in einem reinem Tris/Acetat-Puffersystem aus [70] und Literaturwerten von rein wässrigen Matrices [39].

KAPITEL X

ANWENDUNGEN

Aus der Vielzahl der während der Anfertigung dieser Arbeit bearbeiteten Projekte zur Bestimmung von Elementkonzentrationen in isolierten Enzymproben sollen in diesem Kapitel nun zwei dieser Projekte näher vorgestellt werden. Dabei wird die Flexibilität der TXRF für vielfältige Fragestellungen aufgezeigt.

10.1 Diisopropylfluorophosphatase (DFPase)

Die DFPase wurde bereits in Kapitel III vorgestellt. Zu Beginn der Arbeit lag noch keine dreidimensionale Struktur dieses Enzyms vor. Anhand früherer TXRF Messungen konnten bereits zwei Calciumionen als Cofaktoren der DFPase festgestellt werden, wobei zwischen einem höher- und einem niederaffin gebundenen Calciumion unterschieden werden konnte [59]. Bekannt war weiterhin die essentielle Rolle des höheraffinen Calciums bei der Strukturstabilisierung. Das niederaffine Calcium ist dagegen vermutlich aktiv am katalytischen Prozess beteiligt. Folgende Fragestellungen sollten nun mit TXRF näher behandelt werden:

1. Metallaustausch über Gleichgewichtsdialyse
2. Metallaustausch durch Rückfaltung der DFPase
3. Bestimmung des Selen Gehaltes einer mit Selenomethionin gelabelten DFPase
4. Untersuchung von Mutanten

10.1.1 Metallaustausch über Gleichgewichtsdialyse

Die Metallaustauschversuche sollten nähere Informationen zur Rolle des niederaffin gebundenen Calciumions in der DFPase bringen. Durch den selektiven Austausch dieses Calciumions mit anderen zweiwertigen Metallionen sollte die Einflussnahme auf die spezifische Aktivität der DFPase untersucht werden. Desweiteren besteht mit Hilfe dieser Metall-derivate die Möglichkeit zur Identifizierung und Differenzierung der beiden Calciumionen in der Röntgenstrukturanalyse [60].

Die Gleichgewichtsdialysen wurden in Gegenwart eines hohen Überschusses an divalenten Metallion und unterschiedlich langen Inkubationszeiten der Metallionen durchgeführt [60].

Metall [Me ²⁺]	Me ²⁺ pro DFPase (TXRF)	Ca ²⁺ pro DFPase (TXRF)	Aktivität ⁽¹⁾ [%] [60]	Bedingungen des Metallaustausches [60]
Ca ⁽²⁾	--	1,8 ± 0,1	100	Standardprobe; Aufreinigung in Gegenwart von 2 mM Ca ²⁺
Mg	nicht best. ⁽³⁾	0,6 – 1,4	106	Gleichgewichtsdialyse über 3 Tage mit 2 mM Mg ²⁺ od. über 6 – 8 Tage mit 100 mM Mg ²⁺
Mn	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	103	Gleichgewichtsdialyse über 3 Tage mit 2 mM Mn ²⁺ od. über 6 – 8 Tage mit 100 mM Mn ²⁺
Co	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,2	105	Gleichgewichtsdialyse über 3 Tage mit 2 mM Co ²⁺ od. über 6–8 Tage mit 100 mM Co ²⁺
Ni	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,3	108	Gleichgewichtsdialyse über 3 Tage mit 2 mM Ni ²⁺
Zn	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1	103	Gleichgewichtsdialyse über 3 Tage mit 2 mM Zn ²⁺ in Gegenwart von 0,5 M NaCl
Cd	1,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1	80	Gleichgewichtsdialyse über 3 Tage mit 2 mM Cd ²⁺ in Gegenwart von 1 M NaCl
Sr	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,3	80	Gleichgewichtsdialyse über 3 Tage mit 1 mM Sr ²⁺
	1,7 – 8,3	0,3 ± 0,01	82	Gleichgewichtsdialyse über 6–8 Tage mit 100 mM Sr ²⁺
Ba	0,6 ± 0,3	1,1 ± 0,2	92	Gleichgewichtsdialyse über 3 Tage mit 2 mM Ba ²⁺
	2,0 – 9,6	0,4 ± 0,1	93	Gleichgewichtsdialyse über 6–8 Tage mit 100 mM Ba ²⁺

Tab. 10.1: TXRF-Ergebnisse des Metallaustausches an DFPase über Gleichgewichtsdialyse.

Die TXRF-Ergebnisse sind in Tab. 10.1 zusammengefasst. Es konnte anhand der TXRF-Messungen gezeigt werden, dass sich das niederaffinere der beiden Ca-Ionen selektiv durch Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Sr²⁺ oder Ba²⁺ ersetzen lässt. Mit Mg²⁺ scheint dies bei Betrachtung der Stöchiometrie des Calciums auch der Fall zu sein. Leider war eine Mg-Bestimmung im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Im Fall von Cd²⁺ ergibt sich eine Bindungsstöchiometrie von 1,5 Cd²⁺ pro DFPase. In Gegenwart hoher Sr²⁺- und Ba²⁺-Konzentrationen sank der Ca²⁺-Gehalt der Proteinproben soweit, dass ein vollständiger Austausch beider Ca-Ionen erfolgt sein muss. Allerdings wurden unter diesen Bedingungen bis zu 9 Metallionen pro DFPase bei starken Schwankungen des Metallgehaltes nachgewiesen. Die beiden Metalle scheinen bei höheren Konzentrationen außen an der Proteinhülle zu haften bzw. es könnten weitere niederaffine Bindungsstellen vorhanden sein.

¹ Die Aktivitätswerte wurden relativ zu dem nicht derivatisierten Enzym bestimmt.

² Ca²⁺ ist der natürliche Cofaktor der DFPase

³ nicht bestimmt; Mg ist mit dem verwendeten TXRF-Gerät nicht bestimmbar; AAS-Messungen waren nicht durchführbar.

Auf die spezifische Aktivität der Probe gab es durch den Metallaustausch keinerlei signifikanten Einfluss. Nur bei dem mit Cd^{2+} , Sr^{2+} oder Ba^{2+} behandelten Enzym wurden leicht niedrigere Aktivitätswerte bestimmt [60]. Von den Mangan- und Nickelderivaten konnten anschließend Kristalle für die Röntgenstrukturanalyse hergestellt werden [60].

10.1.2 Metallaustausch durch Rückfaltung der DFPase

Eine weitere Möglichkeit Metallaustausch an Proteinen herbeizuführen ist das Verwenden von bestimmten Chelatoren wie EDTA. Nach dem Entfernen des Metalls durch EDTA kann anschließend das gewünschte Metall in das Enzym eingebracht werden. Unter nativen Bedingungen erfolgt durch Zusatz von EDTA eine irreversible Denaturierung der DFPase [59]. Unter bestimmten Bedingungen war jedoch eine Renaturierung des mit EDTA behandelten Enzyms möglich [60].

Die TXRF-Analyse des Metallgehaltes nach Rückfaltung der DFPase in einem von Metallionen freien Puffer bestätigte den vollständigen Verlust und somit die vollständige Chelatisierung der beiden Calciumionen durch EDTA. In dem auch enzymatisch inaktiven Protein [60] konnte kein Calcium mehr bestimmt werden. Bei der anschließend in Gegenwart von 2 mM Ca^{2+} rekonstruierten Probe zeigten die TXRF-Analysen jedoch einen nicht stöchiometrischen Einbau der Metallionen. Es wurden mehr als 30 Calcium pro DFPase bestimmt. Daher war ein selektiver Austausch von Metallionen auf diesem Wege nicht möglich. Eine ungenügende Entfernung des Calciums im Zuge der Probenvorbereitung für die TXRF-Analysen wurde ausgeschlossen, da das native Enzym sich vor dem Umpufferungsvorgang ebenfalls in einem 2 mM Ca^{2+} -ionenhaltigen Puffer befindet. Nach dem Umpuffern wurde an dieser Probe mittels TXRF ein Calciumgehalt von $1,8 \pm 0,1$ Calcium pro DFPase bestimmt (vgl. Tab. 10.1).

10.1.3 Bestimmung des Selen Gehaltes der mit Selenomethionin gelabelten DFPase

Schwermetallatomderivate von Proteinen werden zur Lösung des Phasenproblems bei der Röntgenstrukturanalyse herangezogen [80]. Diesem geht in der Regel eine aufwendige Suche nach geeigneten Schwermetallatomderivaten voraus. Eine weitere Möglichkeit zur Lösung des Phasenproblems stellt das Prinzip der multiplen anomalen Dispersion (MAD) mit Hilfe von Selenomethioninderivaten dar [81]. Für die Aufnahme der Datensätze sind Messungen mit Synchrotron-Strahlung notwendig. Da die Messzeiten am Synchrotron begrenzt und teuer sind, sollte der Selengehalt der mit Selenomethionin derivatisierten Enzymprobe im Vorhinein bestimmt werden.

Mit TXRF konnte ein Selengehalt von 6,8 Selen pro Protein in den Derivaten bestimmt werden. In der gelösten Röntgenstruktur des Proteins konnten im nachhinein 7 der 8 möglichen Methionine bestimmt werden. In allen detektierten Methioninen war der Schwefel durch Selen ersetzt. Ein Methionin wurde vermutlich posttranslational abgespalten.

10.1.4 Untersuchung von Mutanten

Zur näheren Charakterisierung des aktiven Zentrums der DFPase wurden verschiedene Mutanten von im aktiven Zentrum befindlichen Aminosäuren hergestellt und untersucht. Bei den Mutanten E21Q und D229N handelt es sich um Aminosäuren der Ca^{2+} -Bindungsstelle. Somit könnte die Mutation zum Verlust des Calciums führen. Bei den übrigen Mutanten handelt es sich um Mutationen in Nachbarschaft des aktiven Zentrums. Die TXRF-Ergebnisse sind in Tab. 10.2 zusammengefasst.

Mutante	Ca^{2+} pro DFPase (TXRF)	durchschnittl. Aktivität ⁽⁴⁾ [%] [60]
Wildtyp	$1,8 \pm 0,1$	100
W244Y	1,9	100
W244H	1,9	73
W244F	1,6	56
W244L	1,9	37,5
S271A	1,8	133,5
E37Q	1,9	56
E21Q	0,8	0
D299N	1,2	0

Tab. 10.2: Ergebnisse der TXRF-Messungen von Mutanten der DFPase im Vergleich zum Wildtypenzym.

Für die beiden Mutanten E21Q und D229N konnte durch die TXRF-Messungen der Verlust des niederaffinen Calciums nachgewiesen werden. Beide Mutanten waren auch enzymatisch inaktiv [60]. Die Stöchiometrien der übrigen Mutanten waren mit dem des Wildtyps vergleichbar und zeigten in Abhängigkeit von der Mutante eine unterschiedlich starke Reduktion der enzymatischen Aktivität. Anhand der erhaltenen TXRF-Ergebnisse der Mutanten in Verbindung mit strukturellen Untersuchungen [60] und Aktivitätstest [60] konnte eindeutig gezeigt werden, dass die beiden Aminosäuren Glu21 und Asp299 an der

⁴ Aktivitätswerte relativ zum Wildtyp-Enzym

Bindung des niederaffinen Calciums beteiligt sind und dieses essentiell für die enzymatische Aktivität und die katalytische Funktion ist.

10.2 Cytochrom *c* Oxidase

Obwohl die Struktur der Cytochrom *c* Oxidase gelöst ist, ist wenig über die Organisation innerhalb des Enzyms bekannt. So sind z.B. die Biogenese der beiden für die katalytischen Funktionen essentiellen *a*-Typ Häm oder der Einbau der Metall Cofaktoren insgesamt weitgehend unbekannt. Frühere Untersuchungen am sogenannten *ctaG*-Gen zeigten, dass dieses Gen der Cytochrom *c* Oxidase bei der Synthese oder dem Einbau der beiden Häm eine entscheidende Rolle zu spielen scheint [82]. Um diese Rolle genauer zu untersuchen wurden Mutanten der Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans* untersucht, bei denen eine Deletion verschieden großer Fragmente des *ctaG*-Gens durchgeführt wurde (PUP205, PUP206, PUP207) [61].

Messungen der enzymatischen Aktivität (Elektronentransfer-Aktivität) und die Bestimmung des Häm : Proteinverhältnisses in den Deletionsmutanten (PUP) der Cytochrom *c* Oxidase ergaben eine deutliche Verringerung der enzymatischen Aktivität sowie einen Verlust des Hämgehaltes von bis zu 80 % [61]. Mittels der TXRF-Analysen sollte nun der Gehalt der redoxaktiven Metallzentren genauer spezifiziert werden.

Mutante	Cu pro COX (TXRF)	Fe pro COX (TXRF)	Fe : Cu
Wildtyp	2,5	1,9	1 : 1,3
PUP205 ⁽⁵⁾	0,8	1,3	1 : 0,6
PUP206 ⁽⁶⁾	1,3	1,3	1 : 1,0
PUP207 ⁽⁷⁾	1,6	1,5	1 : 0,9

Tab. 10.3: Elementgehalte von Deletionsmutanten (PUP) der Cytochrom *c* Oxidase (COX) im Vergleich zum Wildtyp-Enzym; Wildtyp-Absolutwerte: 3 Cu und 2 Fe pro Enzym (Fe : Cu = 1 : 1,5).

Die TXRF-Ergebnisse der bestimmten redoxaktiven Metallzentren in Tab. 10.3 zeigen bei den drei untersuchten Deletionsmutanten PUP205, PUP206 und PUP207 einen teilweisen Verlust an beiden Metallzentren auf. Die Absolutwerte sind allerdings nicht ganz eindeutig.

⁵ PUP205 (Δ *ctaG*::Km^r, 755 Bp)

⁶ PUP206 (Δ *ctaG*::Km^r, 546 Bp)

⁷ PUP207 (Δ *ctaG*::Km^r, 630 Bp)

Ein Grund dafür könnte sein, dass die untersuchten Mutanten aus einer Mischung aus noch strukturell intakten und durch teilweise Verluste der Cofaktoren charakterisierten Proteinkomplexen bestehen. Die Eisen : Kupfer Verhältnisse weisen aber auf den Verlust von mindestens einem Cu-Atom aus dem Enzymkomplex der Cytochrom *c* Oxidase hin. Im Fall der Deletionsmutante PUP205 deuten die Absolutwerte und das berechnete Metall Verhältnis sogar auf den Verlust zweier Cu-Atome hin. Bei allen drei Mutanten muss aber bei Betrachtung der Absolutwerte auch ein Verlust von mindestens einem Fe-Atom und somit eines Häms in Betracht gezogen werden. Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen scheint die Bedeutung des *ctaG*-Gen nicht bei der Häm-*a*-Synthese zu liegen, sondern bei einer Beteiligung am Einbau von Häm oder Kupfer in die Struktur der Cytochrom *c* Oxidase [61].

KAPITEL XI

ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Während der letzten Jahrzehnte hat sich die Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TXRF) als eine tragende Methode in der Elementanalytik etabliert. Sie ist eine universelle, auf vielen Gebieten einsetzbare, ökonomische Multielementmethode zur Mikro- und Spurenanalyse. Die Vorteile der TXRF mit ihrer hohen Empfindlichkeit kombiniert mit einer einfachen Quantifizierung und einem geringen Probenverbrauch prädestinieren sie für Elementbestimmungen in verschiedenen biologischen Matrices - besonders auf dem Gebiet der Protein- und Enzymanalytik. Das Potential der TXRF für die Bestimmung von Übergangsmetallen in diesen Matrices wurde schon in der Literatur beschrieben. Eine bedeutende Rolle kommt hier auch der Analyse leichter Elemente zu, insbesondere der des Schwefels. Als Bestandteil der beiden Aminosäuren Cystein und Methionin erlaubt die quantitative Bestimmung des Schwefelgehaltes eine zur Metall-Cofaktoren-Bestimmung einfache und simultane Bestimmung der Enzym- oder Proteinkonzentration. Die Evaluation dieses Verfahrens mit seinen Möglichkeiten und Grenzen für die TXRF, sowie die Weiterentwicklung von Anwendungsgebieten auf diesem Gebiet waren die vorrangigen Ziele dieser Arbeit.

Zuvor erfolgte eine Überprüfung der für die quantitative Auswertung notwendigen und wichtigen relativen Empfindlichkeitsfaktoren (Kalibrierfaktoren). Für die beiden untersuchten leichteren Elemente Schwefel und Phosphor ließen sich im Gegensatz zu den höheren Elementen Abweichungen von $> \pm 10\%$ zu den in der Spektrometer-Software bereits vorinstallierten Faktoren feststellen. Die Betrachtung der Matrix- und Konzentrationsabhängigkeit des relativen Empfindlichkeitsfaktors von Schwefel zeigte eine starke Matrixabhängigkeit des Faktors bei höheren Konzentrationen. Hier spielen vorrangig Absorptionseffekte der induzierten Fluoreszenzstrahlung des Schwefels in den unterschiedlich massiven Rückständen der untersuchten Verbindungen $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, MgSO_4 und Na_2SO_4 eine entscheidende Rolle.

Im Zuge der Probenvorbereitung für die Analyse der Protein- und Enzymproben erwies sich die Trocknung an Luft bei Raumtemperatur als eine gut geeignete Methode im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren (Trocknung unter Wärmezufuhr). Bei letzterem Verfahren besteht die Gefahr möglicher Elementverluste von flüchtigen Verbindungen z. B. beim Vorhandensein sulfidischer Bestandteile. Der Einfluss der Matrixbestandteile (Puf-

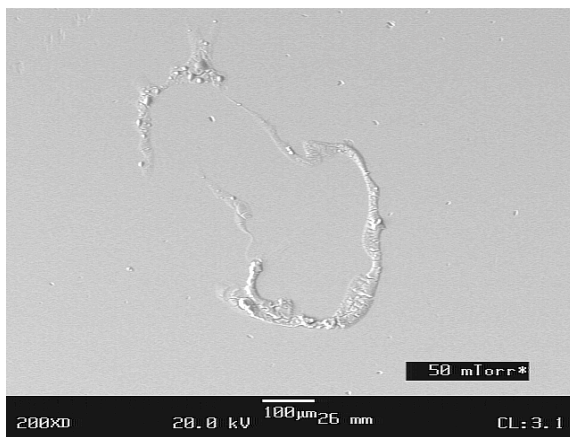
fer/bio-organische Matrix der Enzyme selbst) und ihre systematischen Zusammenhänge auf die ausgebildeten Trocknungsrückstände zeigten sich deutlich in den zur Evaluation der Schwefelbestimmung durchgeführten Konzentrationsreihen mit schwefelhaltigen anorganischen Standardlösungen. Bei den beiden untersuchten Enzymen Diisopropylfluorophosphatase (DFPase) und Cytochrom *c* Oxidase wurden über die durchgeführten Konzentrationsbereiche sehr gute Wiederfindungen dokumentiert. Bei der Cytochrom *c* Oxidase trägt vor allem der im Vergleich zur DFPase deutlich höhere Anteil an Pufferkomponenten zur Ausbildung massiverer Trocknungsrückstände (max. 5 μm Dicke) bei. Dennoch traten erst bei der NADH:Q Oxidoreduktase (Komplex I) deutliche, reproduzierbare Minderbefunde bei der Schwefelbestimmung im Verlauf der Konzentrationsreihe auf. Anhand der topologischen Untersuchungen ließen sich hier für die Minderbefunde Schichtdickeneinflüsse und eine damit verbundene Absorption der emittierten Fluoreszenzstrahlung verantwortlich machen. Der Einsatz von sogenannten Filmbildnern zur Minimierung der Schichtdicken von Trocknungsrückständen und der damit verbundenen besseren Elementwiederfindungen brachte dagegen keine deutlichen und reproduzierbaren Verbesserungen, insbesondere nicht für den Schwefel. Eine Erhöhung der Anregungseffizienz durch die Verwendung einer Cr-K α -Strahlung zeigte in den untersuchten Proben (wässrige Matrix/Enzymmatrix: DFPase) keine deutlichen Vorteile in der Bestimmung des leichten Elementes. Die beiden, in herkömmlichen Spektrometern zur Verfügung stehenden, Anregungsmoden W-L α und Mo-K α , sind für die Analyse von Enzymproben und einer vergleichenden Bestimmung der Enzymkonzentration gut geeignet. Dies zeigten auch Vergleiche mit den biochemisch bestimmten Protein- bzw. Enzymkonzentrationen. Kritische Schichtdicken im Rahmen von Schwefel-Bestimmungen wurden für die verwendeten Anregungsmoden auf etwa 20 μm (Mo-K α), 3 μm (W-L α) und rund 2 μm (Cr-K α) kalkuliert. Eine Beeinträchtigung der Zuverlässigkeit der TXRF-Messungen für die höheren Elemente durch die Matrixbestandteile konnte nicht festgestellt werden. Somit wird in den meisten Fällen die einfache Probenpräparation auf hydrophoben oder hydrophilen (siliconisierten/unsiliconierten) Probenträgern, ohne die Notwendigkeit eines Verfahrens zur vorherigen Matrixabtrennung, möglich sein. Jedoch muss bei allen künftig zu untersuchenden Protein- oder Enzymproben mit hohen Matrixanteilen mit dem Auftreten von Schichtdickeneffekten und damit verbundenen Absorptionseffekten von leichten Elementen (Schwefel, Phosphor) gerechnet werden. Die in der Arbeit vorgestellten, unterschiedlichen Projekte zeigen deutlich das Potential der TXRF als eine Standardmethode auf diesem Anwendungsgebiet.

Anhang

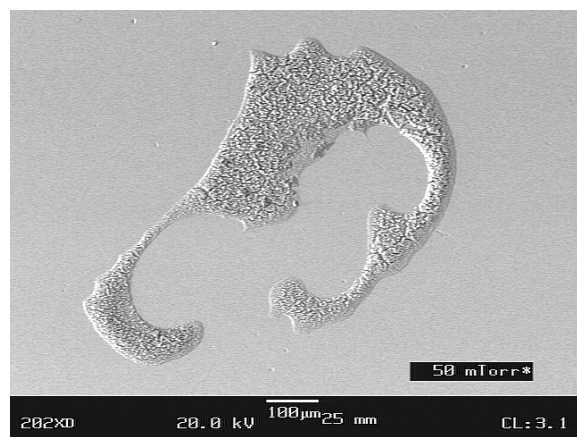
A. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

A.1 REM-Aufnahmen zur Untersuchung der Matrix/Konzentrationsabhängigkeit des relativen Empfindlichkeitsfaktors für das Element Schwefel (Kap. IV)

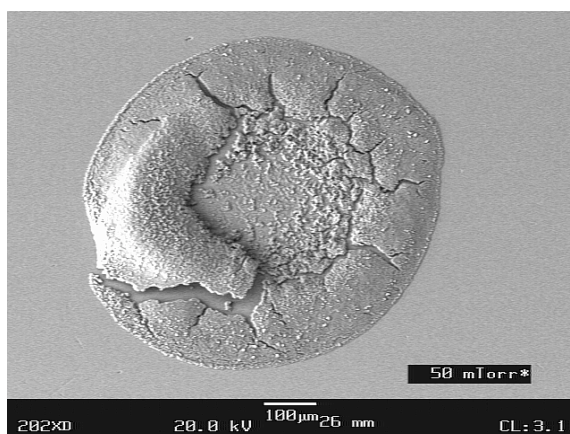
REM-Aufnahmen von Trocknungsrückständen mit unterschiedlichen Massenverhältnisse Schwefel (aus MgSO_4) zu Referenzelement (Cr).



10 ng S / 10 ng Cr



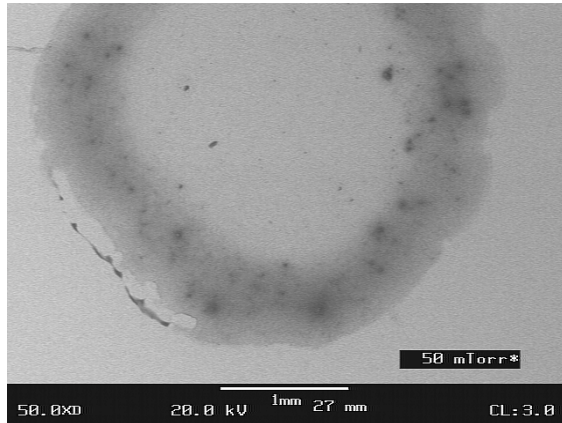
100 ng S / 10 ng Cr



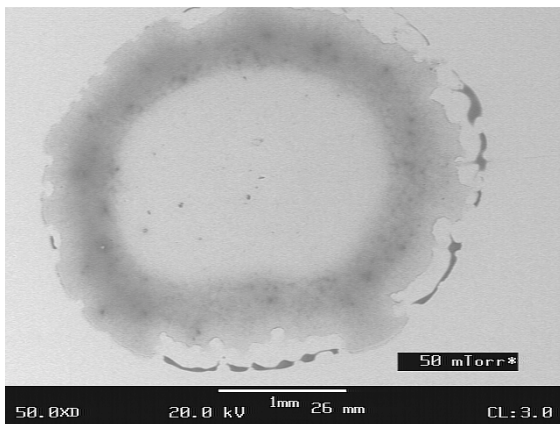
500 ng S / 10 ng Cr

A.2 REM-Aufnahmen zur Evaluation der Schwefelbestimmung von DFPase (Kap. 6.1.2)

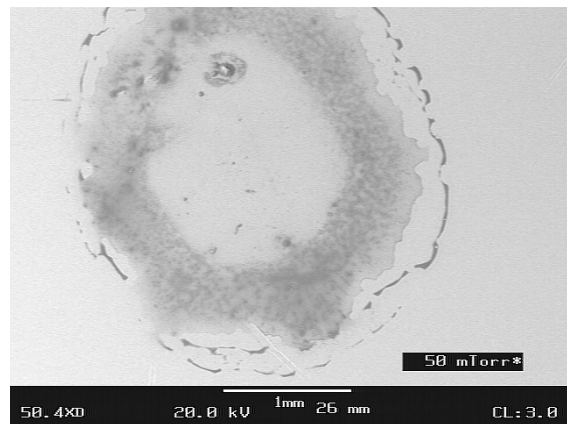
REM-Aufnahmen der Trocknungsrückstände von DFPase sowie nach Zugabe der verschiedenen schwefelhaltigen Aufstocklösungen



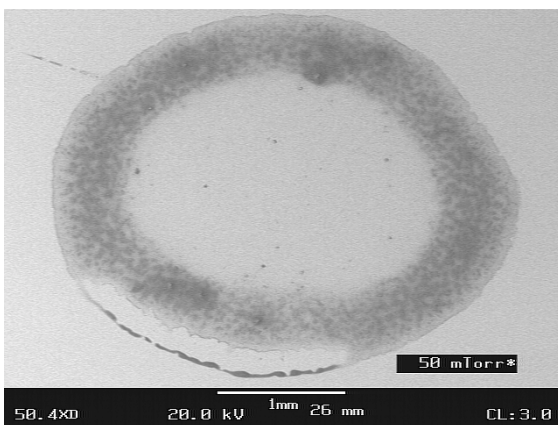
DFPase (ohne Additionszusätze)



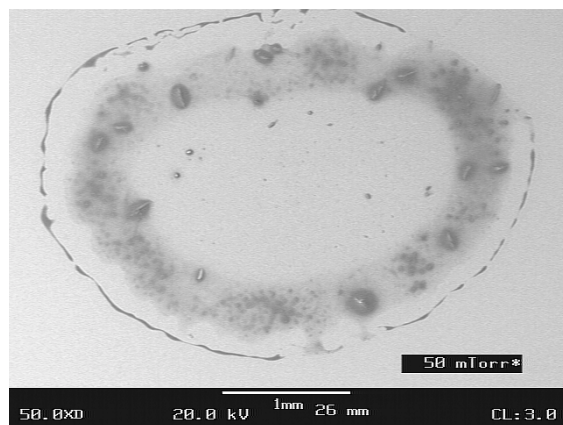
1. Addition (Zugabe von 2 ng S)



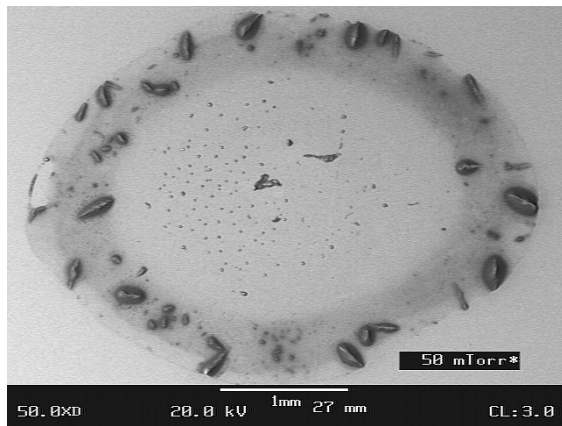
2. Addition (Zugabe von 4 ng S)



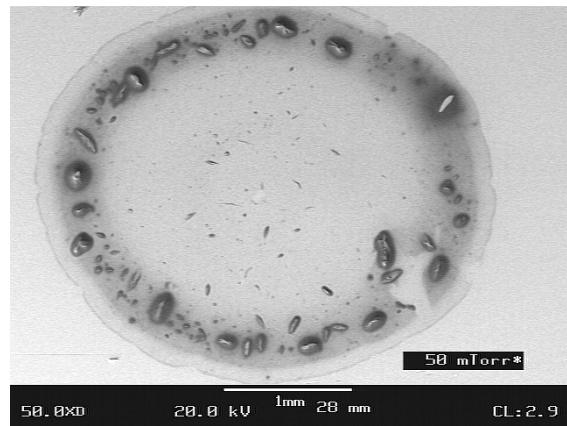
3. Addition (Zugabe von 10 ng S)



4. Addition (Zugabe von 20 ng S)



5. Addition (Zugabe von 40 ng S)

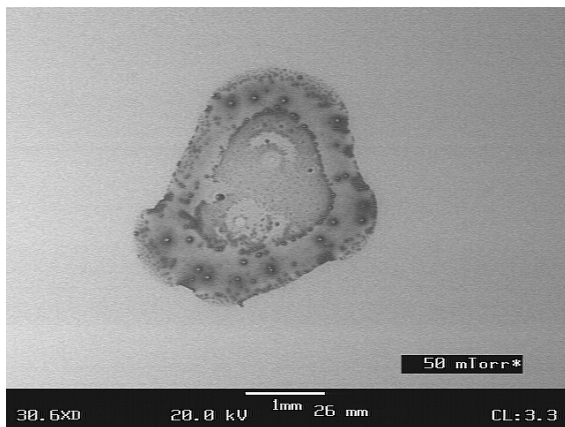


6. Addition (Zugabe von 80 ng S)

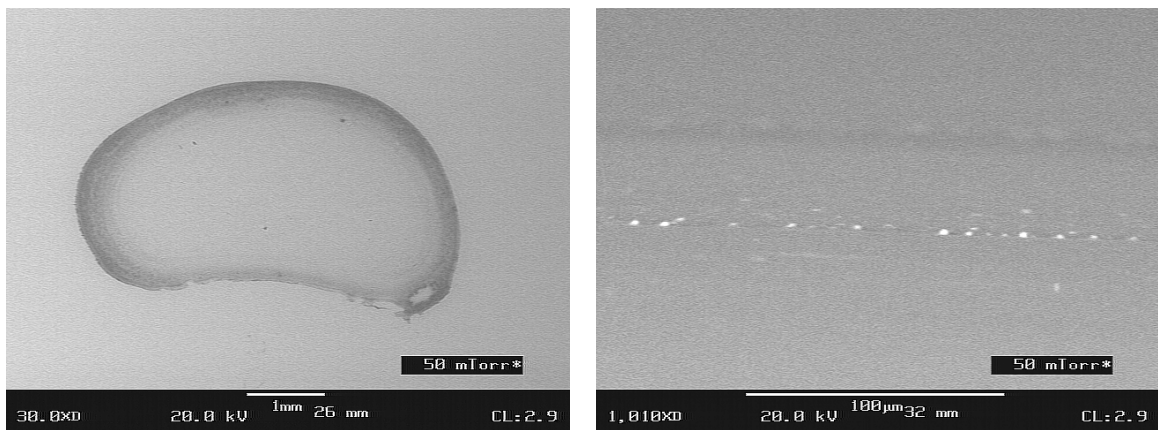
A.3 REM-Aufnahmen vor und nach der Beeinflussung der Rückstandsbildung von DFPase und Cytochrom c Oxidase (Kap. VII)

REM-Aufnahmen der Trocknungsrückstände auf siliconisierten und unsiliconierten Probenträgern, sowie nach Zusatz der in Kap. VII beschriebenen Filmbildner zu Proben von DFPase und Cytochrom c Oxidase. Dargestellt sind Aufnahmen mit Kippwinkeln der Probenhalterung von 20° (links) und 90° (Seitenansicht, rechts).

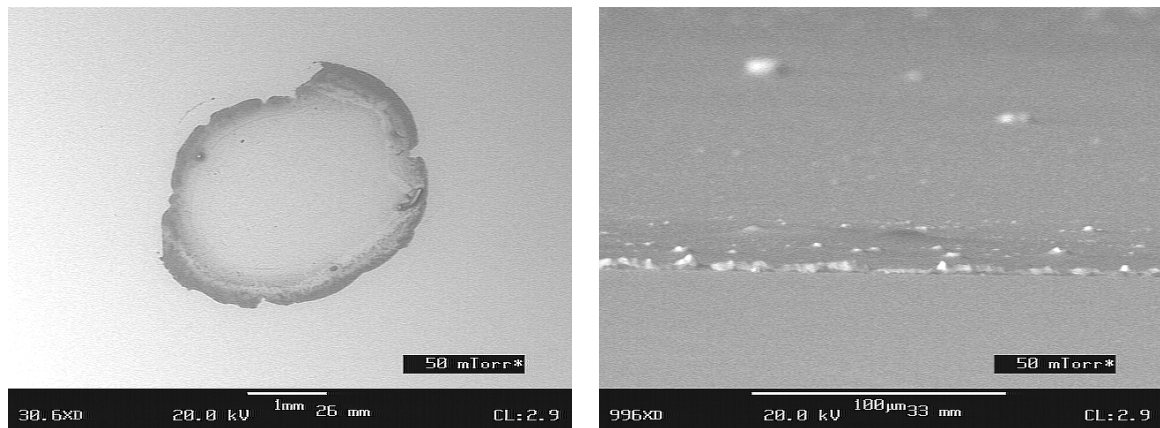
A.3.1 DFPase



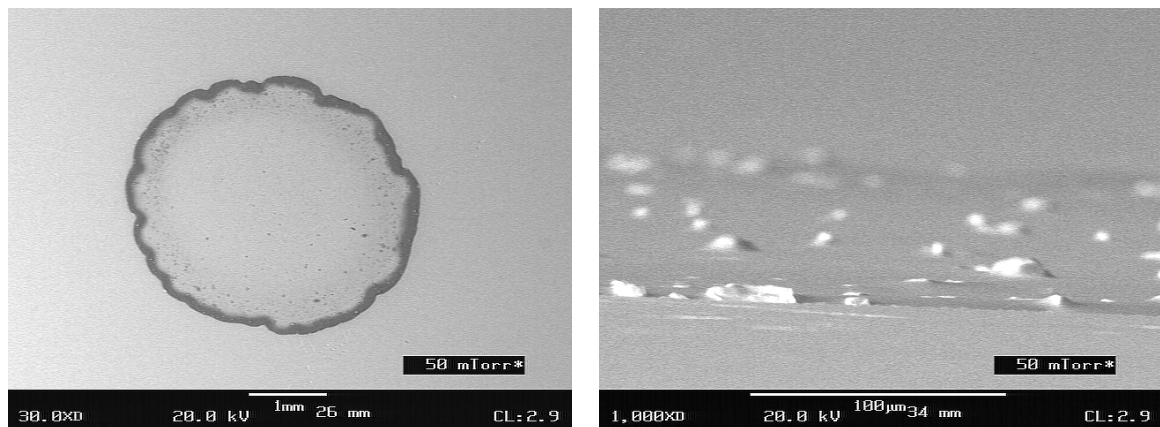
Trocknungsrückstand auf siliconisierten (hydrophoben) Quarzprobenträger



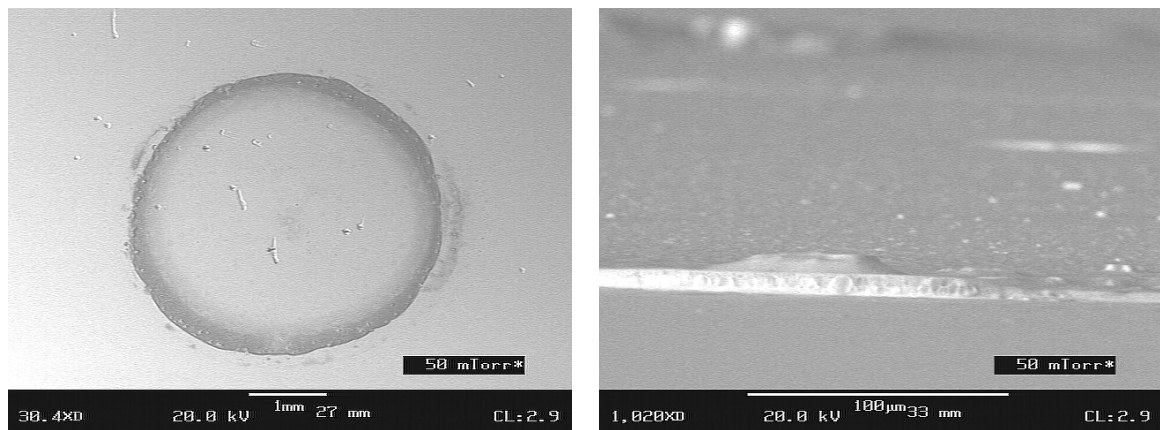
Trocknungsrückstand auf unsilicisierten (hydrophilen) Quarzprobenträger



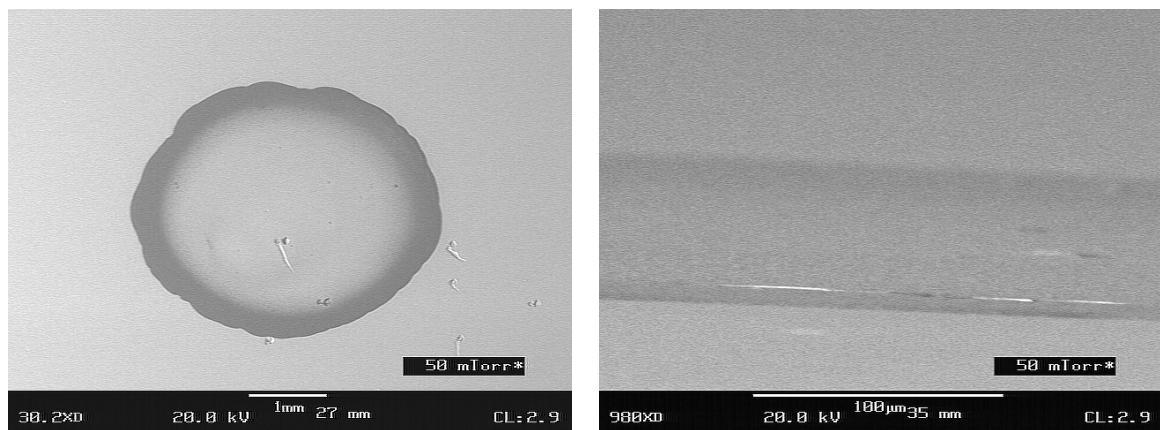
Trocknungsrückstand nach Zusatz von 2 µl PVA (0,01 %)



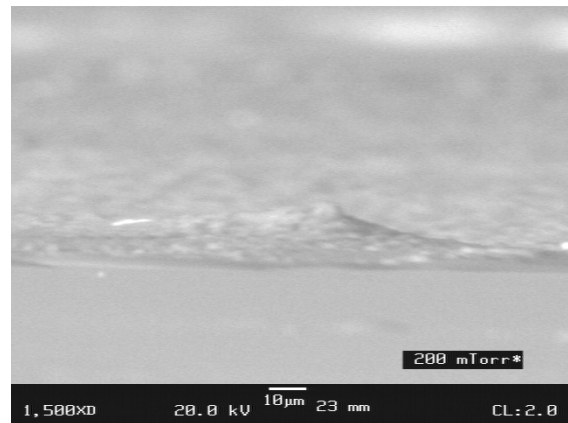
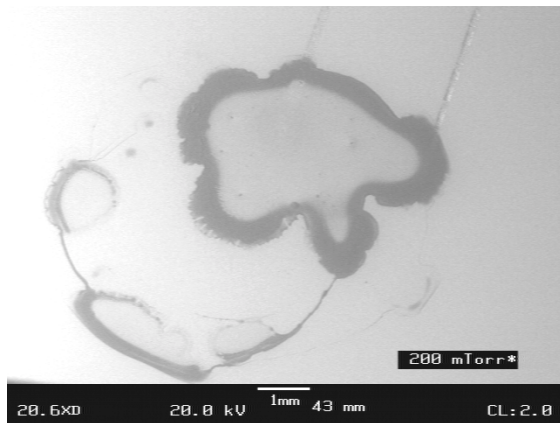
Trocknungsrückstand nach Zusatz von 2 µl Gelatinelösung (0,1 %)



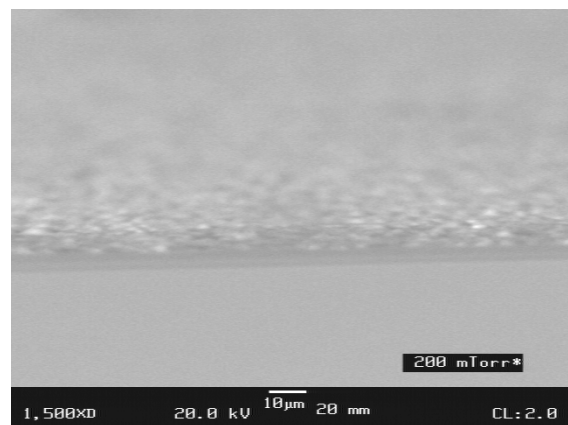
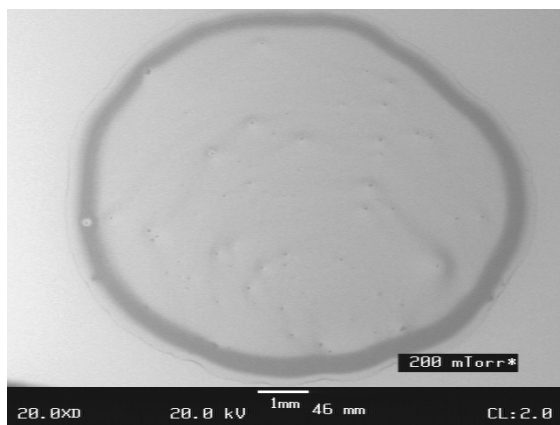
Trocknungsrückstand nach Zusatz von 2 µl Flusssäure (1 %)



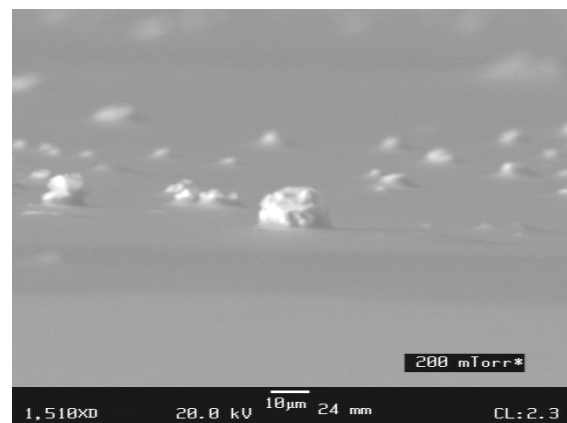
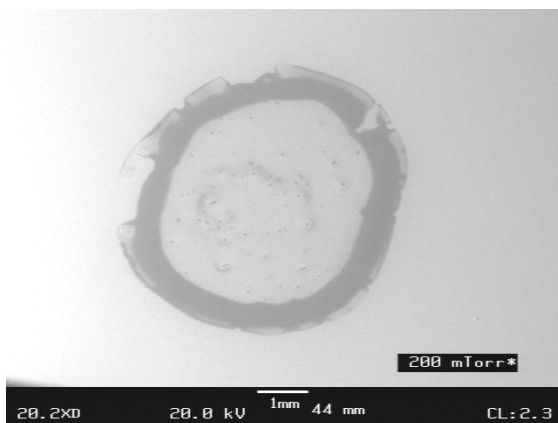
Trocknungsrückstand nach Zusatz von 2 µl Äpfelsäure (1 %)

A.3.2 Cytochrom *c* Oxidase

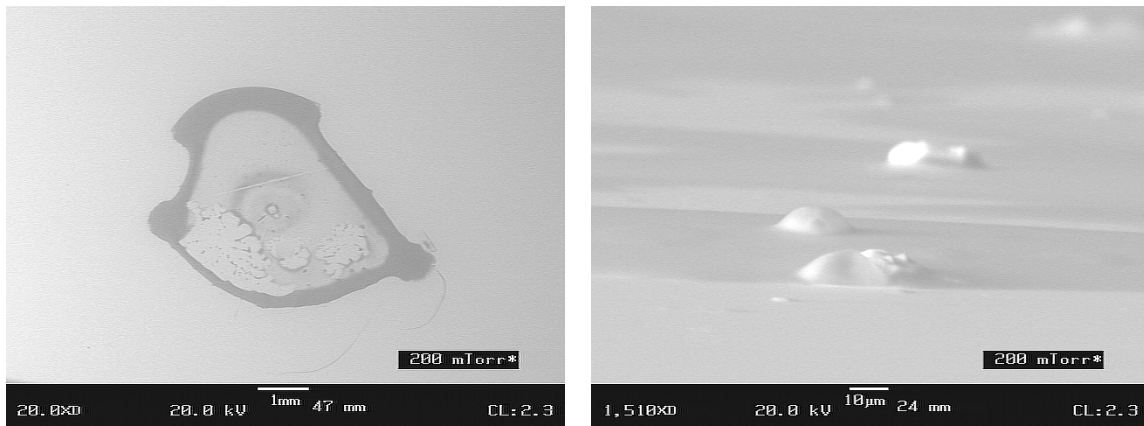
Trocknungsrückstand auf siliconisierten (hydrophoben) Quarzprobenträger



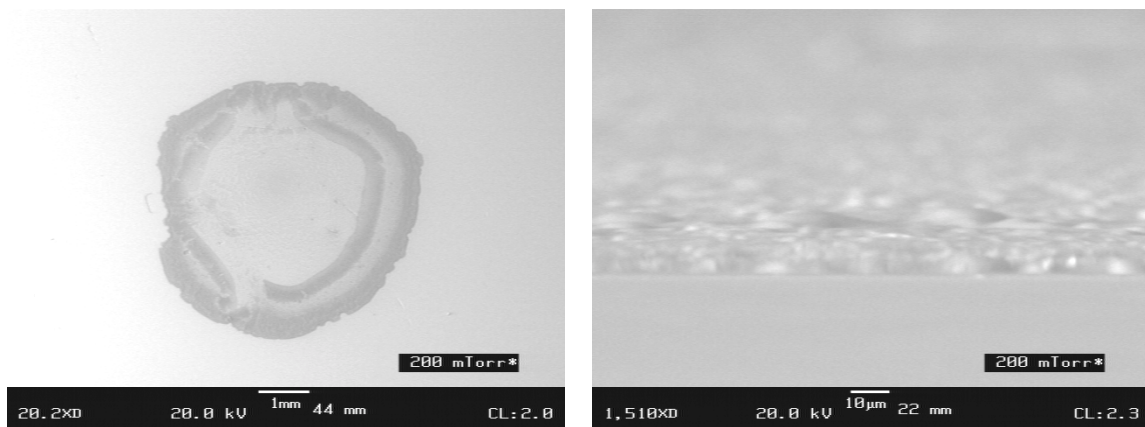
Trocknungsrückstand auf unsilicisierten (hydrophilen) Quarzprobenträger



Trocknungsrückstand nach Zusatz von 2 μl PVA (0,01 %)



Trocknungsrückstand nach Zusatz von 2 µl Gelatinelösung (0,1 %)



Trocknungsrückstand nach Zusatz von 2 µl Flusssäure (1 %)

B. Statistische Prüfmethoden

Statistische Prüfmethoden ermöglichen eine objektive Überprüfung einer aufgestellten Hypothese. Durch Berechnung einer Prüfgröße aus den Messwerten lässt sich mit einer festzulegenden Wahrscheinlichkeit, aus der ein entsprechendes Intervall der Prüfverteilung resultiert, die aufgestellte Hypothese bestätigen oder widerlegen.

B.1 Ausreißertest

Man ordnet die Messwerte der Größe nach und bildet

$$Q = \frac{|x_A - x_N|}{R} \quad \text{Gl. B.1}$$

Dabei ist x_A der ausreißerverdächtige Wert, x_N der Benachbarte. R ist die Variationsbreite: $R = x_{\max} - x_{\min}$. x_{\max} bezeichnet den größten, x_{\min} den kleinsten Wert der Messreihe. Gilt $Q > Q(\bar{P}, n_j)$ so ist bewiesen, dass x_A ein Ausreißer ist. Die Werte für $Q(\bar{P}, n_j)$ sind Tabelle B.1 zu entnehmen.

n_j	$\bar{P} = 0,90$	$\bar{P} = 0,95$	$\bar{P} = 0,99$
3	0,89	0,94	0,99
4	0,68	0,77	0,89
5	0,56	0,64	0,76
6	0,48	0,56	0,70
7	0,43	0,51	0,64
8	0,40	0,48	0,58

Tab. B.1: Zahlenwerte für $Q(\bar{P}, n_j)$ [83]

\bar{P} steht für den Wahrscheinlichkeitsbereich der σ -Verteilung, innerhalb dessen die Messwerte noch berücksichtigt werden sollen, n_j für die Anzahl der Messwerte. Ein Ausreisser ist umso sicherer auszumachen, je häufiger die Messung wiederholt wird.

B.2 Grubbs-Beck-Ausreißertest

Beim Grubbs-Beck-Ausreißertest [84] werden ausreißerverdächtige Werte zur Mittelwertbildung und zur Berechnung der Standardabweichung berücksichtigt. Hierzu wird nach Gl. B.2 eine den vermeintlichen Ausreißer x_a enthaltende Prüfgröße PG mit einer von der Zahl

der vorliegenden Parallelmessungen n und der gewünschten statistischen Sicherheit P abhängenden Größe r verglichen:

$$PG = \frac{|x_a - \bar{x}|}{s} \geq r(n, P) \quad \text{Gl. B.2}$$

PG: Prüfgröße

x_a : ausreißerverdächtiger Wert

\bar{x} : Mittelwert aus den Einzelwerten x_i

s : Schätzwert der Standardabweichung

n : Anzahl der Parallelmessungen

P : gewünschte statistische Sicherheit

Je nach gewählter statistischer Sicherheit können wahrscheinliche ($P = 95 \%$) oder signifikante ($P = 95 \%$) Ausreißer erkannt und von der Datenmenge ausgeschlossen werden. Der gewählten statistischen Sicherheit und der Anzahl der Parallelmessungen entsprechenden Vergleichswert r sind Statistiktabelle zu entnehmen [84].

C. Technische Daten und Apparatives

C.1 Verwendete Geräte

TXRF-Spektrometer (Frankfurt)	Extra II A, Firma ATOMIKA Instruments GmbH (Oberschleisheim); Standardsoftware (Version 3.0)
TXRF-Spektrometer (München)	PADRAY, Firma GeMeTec (München)
Schichtdickenmessgerät	Tencor <i>ALPHA</i> -Step 200
Rasterelektronenmikroskop (REM)	AMRAY 1920 Eco

C.2 Verwendete Materialien und Chemikalien

Chromstandardlösung	Cr(III)-Ionen Standardlösung in Salpetersäure; 1.000 g/l; Fluka
Manganstandardlösung	Mn Atomspektroskopie-Standardlösung Fluka; 1.000 g/l in Salpetersäure
Multielementstandardlösung	Merck ICP-Mehrelement-Standardlösung IV (23 Elemente) in verdünnter Salpetersäure (1 mol/l)
Rubidiumstandardlösung	Single-Element Rb Standard; Rb in 1 % Salpetersäure; $1.000 \pm 3 \mu\text{g/ml}$; CPI International
Scandiumstandardlösung	Sc Standardlösung 1.000 mg/l; Sc(III)-oxid in Salpetersäure (1 mol/l); Merck
Yttriumstandardlösung	Y Standardlösung Y(III)-nitrat in Salpetersäure; 1.000 mg/l Y; Merck
Aluminiumsulfat	Aluminiumsulfat hexadecahydrat p.a.; Fluka
Magnesiumsulfat	Magnesiumsulfat-7hydrat; reinst; Riedl-de Haën
Nickelsulfat	Nickelsulfat-6hydrat; reinst; Riedl-de Haën
Äpfelsäure	DL-Äpfelsäure für biochemische Zwecke; Merck
Flusssäure	Merck VLSI Selectipur, 50%ig
Polyvinylalkohol	PVA 72000; zur Synthese; Merck
Reinstwasser	Milli-Q TM UF ⁺ /18,2 Ωcm , Typ 1, Firma Millipore

Salpetersäure	Merck VLSI Selectipur; 65 %ig
Reinigungskonzentrat	RBS 50; Reinigungskonzentrat; pH 12 – 13; Roth
Siliconlösung	Serva Siliconlösung in Isopropanol
Pipetten, Pipettenspitzen	Firma Eppendorf
Probenträger	Quarzglas; Fa. Westdt. Quarzschmelze; Ø 30 mm; Stärke 3 mm; Polierung $> \lambda/4$

Literaturverzeichnis

- [01] B. Baumgardt, E. Jackwerth, H. Otto, G. Tölg
Fresenius Z. Anal. Chem. **323 (5)**, 481 (1986)
- [02] R.A. Stripp, D.C. Bogen
J. Anal. Toxicol. **13 (1)**, 57 (1989)
- [03] Y. Gelinias, M. Youla, R. Beliveau, J.P. Schmidt
Anal. Chim. Acta **269 (1)**, 115 (1992)
- [04] K. Günter, A. von Bohlen, G. Paprott, R. Klockenkämper
Fresenius Z. Anal. Chem **342 (4-5)**, 444 (1922)
- [05] R. Michel, F. Löer, M. Nolte, M. Reich, J. Zilkens
Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, Articles, **113 (1)**, 83 (1987)
- [06] K.H. Ng, D.A. Bradley, L.M. Looi, C.S. Mahmood, A.K. Wood
Appl. Radiat. Isot. **44 (3)**, 511 (1993)
- [07] A. Knöchel
Fresenius Z. Anal. Chem. **337**, 614 (1990)
- [08] Fei He, M.C. Buoso, E. Burattini, S. Fazinic, S. Galassini, A.M.I. Haque, M. Jaksic,
G. Moschini
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A **334**, 238 (1993)
- [09] A. Prange, H. Böddeker, W. Michaelis
Fresenius Z. Anal. Chem. **335**, 914 (1989)
- [10] Bethel, V. Hamm, A. Knöchel
Fresenius Z. Anal. Chem. **335**, 855 (1989)
- [11] R.E. Ayala, E.M. Alvarez, P. Wobrauschek
Spectrochim. Acta **46B**, 1429 (1991)
- [12] E.D. Greaves, J. Meitin, L. Sajo-Bohns, C. Castelli, J. Liendo, C. Borgerg
Adv. X-Ray Chem. Anal. Jpn. **26s**, 47 (1995)
- [13] A. von Bohlen, R. Klockenkämper, G. Tölg, B. Wiecken
Fresenius Z. Anal. Chem. **331**, 454 (1988)
- [14] R. Klockenkämper, A. von Bohlen, B. Wiecken
Spectrochim. Acta **44B**, 511 (1989)
- [15] A. Prange, H. Schwenke
Adv. X-Ray Anal. **35B**, 899 (1992)
- [16] A. von Bohlen, P. Rechmann, J.L. Tourmann, R. Klockenkämper
J. Trace Elem. Elctrolytes Health Dis. **8**, 37 (1994)
- [17] G. Bellisola, F. Pasti, M. Valdes, A. Torboli
Spectrochim. Acta **54B**, 1481 (1999)
- [18] A. Wittershagen, P. Rostam-Khani, O. Klimmek, R. Groß, V. Zickermann, I. Zickermann,
S. Gemeinhardt, A. Kröger, B. Ludwig, B.O. Kolbesen
Spectrochim. Acta **52B**, 1033 (1997)

- [19] A. Wittershagen, P. Rostam-Khani, V. Zickermann, I. Zickermann, S. Gemeinhardt, B. Ludwig, B.O. Kolbesen
Fresenius J. Anal. Chem., **361**, 326 (1998)
- [20] R. Fernández Ruiz, J.D. Tornero, V.M. González, C. Alonso
Analyst, **124**, 583 (1999)
- [21] W. Kaim, B. Schwederski
Bioanorganische Chemie
Teubner Studienbücher Chemie, 2. Auflage, Stuttgart (1995)
- [22] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall
J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951)
- [23] M.A. Markwell, S.M. Haas, L.L. Bieber, N.E. Tolbert
Anal. Biochem. **87**, 206 (1978)
- [24] A. Helenius, K. Simons
J. Biol. Chem, **247**, 3656 (1972)
- [25] A. Prange, K. Kramer, U. Reus
Spectrochimica Acta **46B**, 1385 (1991)
- [26] U. Reus
Spectrochimica Acta **46B**, 1403 (1991)
- [27] K. Günther, A. von Bohlen
Spectrochimica Acta **46B**, 1413 (1991)
- [28] R.E. Ayala, E.M. Alvarez, P. Wobrauschek
Spectrochimica Acta **46B**, 1429 (1991)
- [29] A.I. Egorov, L.P. Kabina, I.A. Kondurov, E.M. Korotkikh, V.V. Martynov, A.F. Shchebetov, P.A. Sushkov
Adv. X-Ray Anal. **35**, 959 (1992)
- [30] U. Reus, B. Markert, C. Hoffmeister, D. Spott, H. Guhr
Fresenius J. Anal. Chem. **347**, 430 (1993)
- [31] R. Pepelnik, B. Erbslöh, W. Michaelis, A. Prange
Spectrochimica Acta **48B**, 223 (1993)
- [32] R. Klockenkämper, A. von Bohlen, L. Moens, W. Devos
Spectrochimica Acta **48B**, 239 (1993)
- [33] A. Prange, U. Reus, H. Böddecker, R. Fischer, F.P. Adolf
Adv. in X-Ray Chemical Analysis, Japan **26s**, 001 (1995)
- [34] M. Wagner, P. Rostam-Khani, A. Wittershagen, C. Rittmeyer, H. Hoffmann, B.O. Kolbesen
Pharmazie **51**, 865 (1996)
- [35] A. Varga, G. Zaray
Spectrochimica Acta **54B**, 1455 (1999)
- [36] P. Eichinger, H.J. Rath, H. Schwenke
ASTM 990 (Eds.) Dinesh C. Gupta [Hrsg.], Semiconductor Fabrication: Technology and Metrology, ASTM **990**, 305 (1989)
- [37] K. Iltgen
Spectrochimica Acta **54B**, 1393 (1999)

- [38] R.S. Hockett
Adv. X-Ray Anal. **37**, 565 (1994)
- [39] R. Klockenkämper
Total-Reflection X-Ray Fluorescence Analysis
Vol. 140 in Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and its Applications; J.D. Winefordner, Series Editor
Wiley Interscience Publication (1997) ISBN 0-471-30524-3
- [40] R.W. James
The Optical Principles of the Diffraction of X-Rays
Cornell University Press, Ithaca, N.Y. (1967)
- [41] M. Born, E. Wolf
Principles of Optics
Pergamon Press, London; 6th ed., reprinted 1993
- [42] P. Wobrauschek, H. Aiginger
Anal. Chem. **47**, 852 (1975)
- [43] International Union of Pure and Applied Chemistry
Nomenclature, Symbols, Units and their usage in Spectrochemical Analysis II. Data Interpretation
Pure Appl. Chem. **45**, 99 (1976)
- [44] U. Reus, K. Freitag, A. Haase, J.F. Alexandre
Spectra 2000 **143**, 42 (1989)
- [45] A. Prange, H. Schwenke
Adv. X-Ray Anal. **35B**, 899 (1992)
- [46] R. Klockenkämper, A. von Bohlen
Spectrochim. Acta **44B**, 461 (1989)
- [47] D.K.G. de Boer
Spectrochim. Acta **46B**, 1433 (1991)
- [48] C. Streli
Spectrochim. Acta **52B**, 281 (1997)
- [49] C. Streli, H. Aiginger, P. Wobrauschek
Spectrochim. Acta **44B**, 491 (1989)
- [50] C. Streli, P. Wobrauschek, H. Aiginger
Adv. X-Ray Anal. **35B**, 947 (1992)
- [51] M. Hein, P. Hoffmann, K.H. Lieser, H.M. Ortner
Fresenius J. Anal. Chem. **343**, 760 (1992)
- [52] C. Streli, H. Aiginger, P. Wobrauschek
Spectrochim. Acta **48B**, 163 (1993)
- [53] C. Streli, H. Aiginger, P. Wobrauschek
Nucl. Instrum. Methods A **334**, 425 (1993)
- [54] C. Streli, P. Wobrauschek, W. Ladisich, R. Rieder, H. Aiginger
X-Ray Spectrom. **24**, 137 (1995)
- [55] K. Freitag, U. Reus, J. Fleischhauer
Spectrochim. Acta **44B**, 499 (1989)

- [56] *ALPHA-Step 200 user's manual*
Tencor Instr., Mountain View, USA,
- [57] Schmidt
Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse
Expert Verlag 1994
- [58] Amray 1920 ECO-SEM user's manual
Amray Inc., Bedford, USA
- [59] J. Hartleib
Dissertation, Universität Frankfurt (2000)
- [60] E.I. Scharff
Dissertation, Universität Frankfurt (2001)
- [61] L. Streyer
Biochemie
Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, New York (1991)
- [62] J. Okun
Dissertation, Universität Frankfurt (1999)
- [63] T. Ohnishi
Biochim. Biophys. Acta **1364**, 186-206 (1998)
- [64] U. Pfitzner
Dissertation, Universität Frankfurt (2000)
- [65] H. Witt, B. Ludwig
J. Biol. Chem. **272**, 5514 (1997)
- [66] T. Haltia
Biochim. Biophys. Acta **1098**, 343 (1992)
- [67] S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig, H. Michel
Nature **376**, 660 (1995)
- [68] G.C. Steffens, R. Biewald, G. Buse
Eur. J. Biochem. **164**, 295 (1987)
- [69] U. Pfitzner, A. Kirichenko, A.A. Konstantinov, M. Mertens, A. Wittershagen,
B.O. Kolbesen, G.C. Steffens, A. Harrenga, H. Michel, B. Ludwig
FEBS Lett. **456**, 365-369 (1999)
- [70] A. Wittershagen
Dissertation, Universität Frankfurt (1999)
- [71] M. Beckhoff
Diplomarbeit, Fachhochschule Münster (1997)
- [72] J.W. Veigele
At. Data Tables **5** (1973)
- [73] E.P. Bertin
Principles and Practice of X-Ray Spectrometric Analysis
Plenum Press, New York (1975)
- [74] J.H. Hubbel, W.J. Veigele, E.A. Briggs, R.T. Brown, D.T. Cromer, R.J. Howerton
J. Phys. Chem. Ref. Data **4**, 471 (1975)

- [75] R. Theissen, D. Vollath
Tabellen der Massenschwächungskoeffizienten von Röntgenstrahlen
Verlag Stahleisen M.B.H. Düsseldorf (1967)
- [76] S. Steinmeyer
Dissertation, Universität Frankfurt
- [77] J. Knoth, H. Schwenke
Fresenius. Z. Anal. Chem. **291**, 200 (1978)
- [78] J. Knoth, H. Schwenke
Fresenius. Z. Anal. Chem. **294**, 273 (1979)
- [79] R. Klockenkämper
Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse
Analytiker Taschenbuch Bd. 10, Springer Verlag Berlin, Heidelberg (1991)
- [80] M.J. Buerger
Kristallographie
Walter de Gruyter, Berlin, New York (1977)
- [81] S. Doublé
Methods Enzymol. **276**, 523 (1997)
- [82] P. Steinrücke
Dissertation, Medizinische Universität Lübeck (1991)
- [83] F.E. Grubbs, G. Beck
Technometrics **14 (4)**, 847 (1972)

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. H. Bock; Prof. Dr. B. Brutschy; Prof. Dr. F.J. Comes; Prof. Dr. E. Egert;
Prof. Dr. J. Engels; Prof. Dr. H. Förster; Prof. Dr. M. Göbel; Prof. Dr. C. Griesinger;
Prof. Dr. K. Hensen; Prof. Dr. G. Kohlmaier; Prof. Dr. B.O. Kolbesen; Prof. Dr. A. Kröger;
Prof. Dr. W. Martiensen; Prof. Dr. J. Mulzer; Prof. Dr. G. Quinkert; Prof. Dr. D. Rehm;
Prof. Dr. W. Sterzel; Prof. Dr. R. Schlögl; Prof. Dr. M. Trömel

Persönliche Daten

Martina Renate Mertens
Oberweid 4a
60529 Frankfurt
Tel.: 069 / 35 41 69
e-mail: m.mertens@web.de
geboren am 11.02.1972 in Frankfurt am Main

Schule

1978 – 1982	Minna-Specht-Schule Grundschule in Frankfurt am Main
1982 – 1991	Carl-Schurz-Schule Gymnasium in Frankfurt am Main
1991	Allgemeine Hochschulreife, Gesamtnote 2,2

Grund- und Hauptstudium

Okt. 1991 – März 1994	Grundstudium Diplom Chemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Mai 1994	Diplom-Chemiker-Vorprüfung, Gesamtnote „sehr gut“
Februar 1996	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung, Gesamtnote „sehr gut“
April – Sept. 1996	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. B. O. Kolbesen mit dem Thema „Korngrößeneinfluss bei der Analyse von Pulvern mit der Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TXRF)“ am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Promotionsstudium

Januar 1997	Beginn der Promotion unter Anleitung von Prof. Dr. B. O. Kolbesen mit dem Thema „Schwefel-Bestimmung in Proteinen und Enzymen mit der Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TXRF) - Möglichkeiten und Grenzen“ am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
-------------	--

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über „Schwefel-Bestimmung in Proteinen und Enzymen mit der Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TXRF) – Möglichkeiten und Grenzen“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben. Ich habe bisher an keiner anderen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht oder die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 31.08.2001

.....