

Multischichtelektrode**Elektroaktive Cytochrom-c-Multischichten in einer Polyelektrolytanordnung****

*Moritz K. Beissenhirtz, Frieder W. Scheller,
Walter F. M. Stöcklein, Dirk G. Kurth,
Helmuth Möhwald und Fred Lisdat**

Die Herstellung von Sensoren und bioelektronischen Bauelementen kann von der Verwendung biologischer Redox- und Erkennungsprozesse profitieren.^[1] Ein geeignetes Modellredoxprotein mit bekannter Funktion und hoher Stabilität ist Cytochrom c.^[2-4] Zahlreiche Versuche zur Immobilisierung dieses Proteins auf Elektrodenoberflächen wurden bereits beschrieben,^[5-9] jedoch muss z. B. zur Herstellung empfindlicherer Sensoren eine Bedeckung erreicht werden, die über eine Monoschicht hinausgeht. In dickeren Filmen oder Multischichten sind aber generell nur die Moleküle in der Nähe der Elektrodenoberfläche elektroaktiv. Daher ist es wichtig, Proteine so zu immobilisieren, dass sie ohne Mediator effektiv Elektronen mit einer Elektrode austauschen können. Dies wurde in dieser Arbeit durch die Schicht-für-Schicht-Technik erreicht, deren Nützlichkeit bei der Konstruktion molekularer Architekturen bereits demonstriert worden war.^[10-15]

Zunächst wurde durch Bindung von gemischten Alkanthiolderivaten mit OH- und COO⁻-Endgruppen auf einer Goldoberfläche und anschließende elektrostatische Adsorption von Cytochrom c (Cyt.c) auf dieser Promotorschicht eine Monoschichtelektrode hergestellt. Vollständig elektroaktive Multischichten wurden durch abwechselnde Inkubation dieser Cyt.c-Monoschichtelektrode in Lösungen von anionischem sulfoniertem Polyanilin (PASA) und kationischem Cyt.c gebildet. Diese Monoschichtanordnung erlaubt eine effiziente Wechselwirkung zwischen Protein und Elektrode.^[16,17] In Abbildung 1 ist die resultierende Proteinanordnung mit PASA als Polyelektrolytbaustein dargestellt. Die schrittweise Adsorption von PASA und Cyt.c wurde durch Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie bestätigt.

[*] Dipl.-Biochem. M. K. Beissenhirtz, Prof. F. W. Scheller,
Dr. W. F. M. Stöcklein, Prof. F. Lisdat
Analytische Biochemie
Institut für Biochemie und Biologie
Universität Potsdam
Karl-Liebknecht-Straße 24–25, H. 25, 14476 Golm (Deutschland)
Fax: (+49) 331-977-5053
E-mail: flisdat@rz.uni-potsdam.de
Dr. D. G. Kurth, Prof. H. Möhwald
Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung
Am Mühlenberg 1, 14476 Golm (Deutschland)

[**] Die Autoren danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (0311487A) und dem Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kultur des Landes Brandenburg (24#2598–04*327) für die finanzielle Unterstützung.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

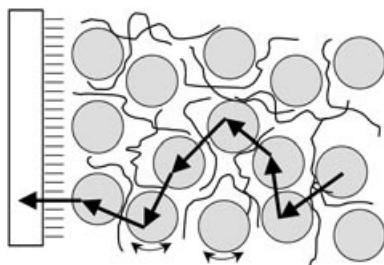


Abbildung 1. Die Multischichtelektrode. Kugeln: Cyt.c; schwarze Fäden: PASA; Rechteck: promotormodifizierte Goldelektrode; Pfeile symbolisieren den postulierten Elektronentransfermechanismus mit flexibler Rotation von Cyt.c.

Diese Technik wurde auch zur Bestimmung der optimalen experimentellen Bedingungen für den Selbstorganisationsprozess genutzt.

Cyclovoltammetrische Untersuchungen zeigten, dass die Zunahme an Proteinbeladung auf der Elektrode der Zunahme an elektrochemisch adressierbaren Cyt.c-Molekülen entspricht. Wiederholte Inkubationsschritte führten zu einer Vergrößerung der voltammetrischen Peakflächen, die eine Quantifizierung der elektroaktiven Proteinmenge erlauben (Abbildung 2). Ein quasireversibler Elektronentransfer zur Elektrode wurde bei einer Schichtdicke von bis zu 15 Proteinschichten beobachtet. Kontrollexperimente, bei denen entweder die PASA- oder die Cyt.c-Lösung durch Puffer ersetzt wurden, zeigten nur das Signal einer Monoschichtelektrode. Offensichtlich sind beide Komponenten für einen erfolgreichen Schichtaufbau notwendig.

Das formale Potential des Proteins beträgt -15 ± 7 mV (gegen Ag/AgCl/1M KCl) und liegt somit innerhalb des Fehlerbereichs für das Potential einer Cyt.c-Monoschichtelektrode (-19 ± 5 mV). Eine Vergrößerung der Peakbreite bei halber Höhe bestätigt das Vorhandensein unterschiedlicher Zustände von Cyt.c innerhalb des Schichtsystems (180 ± 9 mV Peakbreite für die Multischicht- und 130 ± 5 mV für die Monoschichtelektrode), wie es für Proteine in leicht unterschiedlichen Mikroumgebungen in einer Polyelektrolytmatrix zu erwarten ist.

Der Mechanismus des Elektronentransfers über größere Distanzen ist eine Besonderheit des untersuchten Systems. Mehrere Experimente weisen darauf hin, dass der Elektronentransfer im Multischichtsystem hauptsächlich von Protein zu Protein stattfindet. Zunächst wurde die Reaktion einer Monoschichtelektrode mit Cyt.c in Lösung untersucht: Die Monoschichtelektrode kann Elektronen mit Cyt.c-Molekülen in der Lösung austauschen. Cyclovoltammogramme einer solchen Elektrode zeigten einen verstärkten Reduktionspeak in Gegenwart von gelöstem Cyt.c (5 mM Phosphatpuffer, pH 7.0; 50 mVs^{-1} ; siehe Hintergrundinformationen). Da Cyt.c in Lösung größtenteils oxidiert vorliegt, müssen die zusätzlichen Elektronen im Reduktionszyklus auf das gelöste Protein übertragen worden sein. Eine Erhöhung der Vorschubgeschwindigkeit eliminierte diesen Effekt, d.h., die elektroaktive Cyt.c-Menge nahm ab, da die Vorschubgeschwindigkeit die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen den Proteinmolekülen überstieg (ab ca. 1 Vs^{-1}).

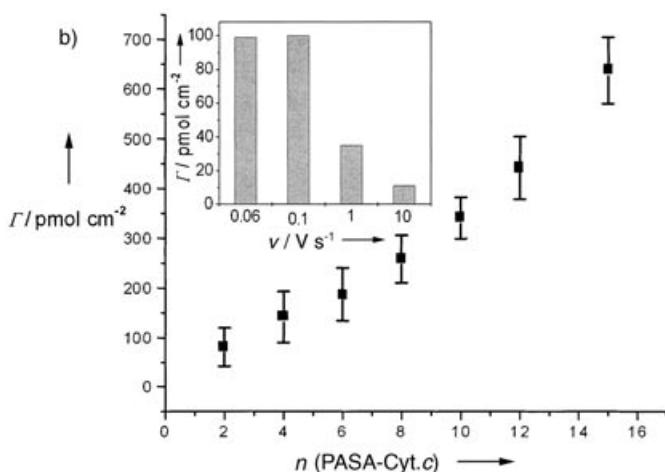
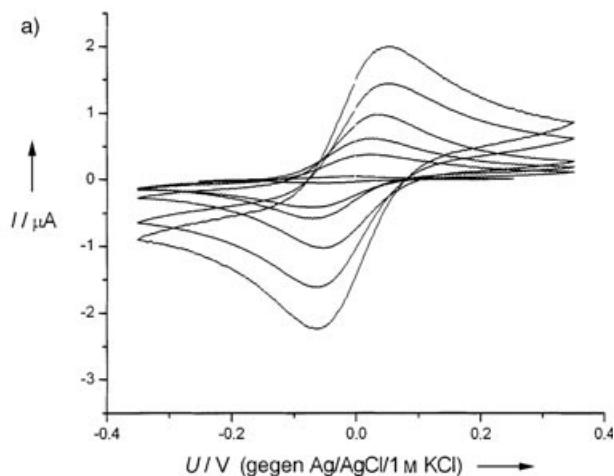


Abbildung 2. a) Cyclovoltammogramme von Multischichtelektroden aus PASA und Cyt.c.; in zunehmender Reihenfolge: Monoschicht, 4, 6, 8, 12 und 15 Schichten Cyt.c.; b) Oberflächendichte von elektroaktivem immobilisiertem Cyt.c in 2–15 Schichten aus Polyelektrolyt und Cyt.c. Einschub: Oberflächendichte von elektroaktivem Cyt.c bei unterschiedlichen Vorschubgeschwindigkeiten. Angabe in Prozent der Cyt.c-Dichte bei 100 mVs^{-1} für eine 8-Schichten-Elektrode; v = Vorschubgeschwindigkeit; n = Zahl der Doppelschichten.

Eine Cyt.c-Monoschichtelektrode, die sich nicht in einer Cyt.c-Lösung befindet, weist dagegen einen quasireversiblen Elektronentransfer mit einem k_s -Wert von $75 \pm 5 \text{ s}^{-1}$ auf, und die Menge an elektroaktivem Cyt.c bleibt von der Vorschubgeschwindigkeit unabhängig. Auch die Multischichtelektrode zeigte eine starke Abnahme der elektroaktiven Cyt.c-Menge mit zunehmender Vorschubgeschwindigkeit (während die Zunahme der Peakseparation bei der Änderung der Vorschubgeschwindigkeit ähnlich wie bei der Monoschichtelektrode verlief). Bei 10 Vs^{-1} sank die von der Elektrode reduzierte Proteinmenge auf etwa 10% der Menge bei 0.1 Vs^{-1} , d.h., die Vorschubgeschwindigkeit war höher als die Elektronentransfersgeschwindigkeit zwischen den Proteinmolekülen (siehe Einschub in Abbildung 2b). Offensichtlich ist die Elektronentransfersgeschwindigkeit zwischen den Proteinen im Netzwerk deutlich langsamer ($k_s = 1.5 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$

für 3–15 Schichten) als die Geschwindigkeit des Elektronenaustausches der Cyt.c-Monoschicht mit der Elektrode.

Die Zugabe des Vernetzungsreagens EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) zu einer Multischichtelektrode verringerte die elektroaktive Cyt.c-Menge deutlich, während die Peakseparation stark zunahm. So zeigten 6-Schichten-Elektroden eine Peakseparation von 280 mV nach EDC-Zugabe gegenüber 80 mV ohne Quervernetzung (0.1 Vs^{-1}). Dies weist darauf hin, dass die Flexibilität der Proteinmoleküle für den effizienten und schnellen Elektronentransfer eine entscheidende Rolle spielt.

Ein weiteres Argument für einen Protein-Protein-Elektronentransfer ist, dass PASA zwischen -0.5 und $+0.5 \text{ V}$ (gegen Ag/AgCl/1 M KCl) keine eigene Redoxaktivität an einer Cyt.c-Monoschichtelektrode zeigt. Dies legt nahe, dass der Polyelektrolyt im Multischichtsystem ausschließlich für die Strukturstabilisierung und nicht für den Elektronentransfer zur Goldoberfläche verantwortlich ist. Ersetzt man PASA durch stärkere Polyanionen wie Polystyrolsulfonsäure oder Polyacrylsäure, wird der Aufbau der Multischichten gestört und so die Bildung einer elektroaktiven Multischichtanordnung verhindert (siehe Hintergrundinformationen).

Um die Theorie des Protein-Protein-Elektronentransfers zu untermauern, wurden Multischichtelektroden mit Apo-Cyt.c hergestellt. Da im Apo-Cyt.c die Hämgruppe entfernt wurde, sollte es den Interprotein-Elektronentransfer unterbinden. Oberflächenplasmonenresonanz-Experimente belegten die Bildung von Apo-Cyt.c/PASA-Multischichten. Tabelle 1 zeigt drei Elektrodenvarianten. System 1 ist eine

Tabelle 1: Aufbau von drei Multischichtelektroden mit Apo-Cyt.c (Apo) zur Untersuchung des Elektronentransfermechanismus.

System 1	MUA/MU-Apo
System 2	MUA/MU-Cyt.c-(PASA/Apo) $\times 4$ -(PASA/Cyt.c) $\times 4$
System 3	MUA/MU-Cyt.c-(PASA/Apo) $\times 12$ -(PASA/Cyt.c) $\times 4$

MUA = 11-Sulfanyl-1-undecansäure; MU = 11-Sulfanyl-1-undecanol

Monoschichtelektrode, bei der das Cyt.c durch Apo-Cyt.c ersetzt wurde. Diese Elektrode war wegen der fehlenden Hämgruppe von Apo-Cyt.c nicht elektroaktiv (der Verlust der Hämgruppe wurde spektroskopisch verifiziert). System 2 enthält eine aktive Cyt.c-Monoschicht, vier Schichten aus Apo-Cyt.c und vier weitere Schichten aus Cyt.c. Cyclovoltammogramme zeigten, dass die hämhaltigen Proteine der äußeren vier Schichten noch mit der Elektrode wechselwirkten. Die Zugabe von EDC zu diesem System führte zum völligen Verlust der Elektroaktivität. Die Barriere aus vier Apo-Cyt.c-Schichten in Verbindung mit der eingeschränkten Mobilität der Proteine verhinderte also den Elektronentransfer zwischen Elektrode und Cyt.c. System 3 schließlich enthält zwölf Schichten aus Apo-Cyt.c zwischen der elektroaktiven Monoschicht und den äußeren Schichten aus hämhaltigem Cyt.c. Cyclovoltammogramme dieses Systems zeigten keine Peaks. Die verbreiterte, elektrochemisch inaktive Barriere blockierte jeglichen Elektronentransfer. Abbildung 3 zeigt die Cyclovoltammogramme der Systeme 2 und 3.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein Protein-Protein-Elektronentransfer den Hauptbeitrag zur elektrochemischen

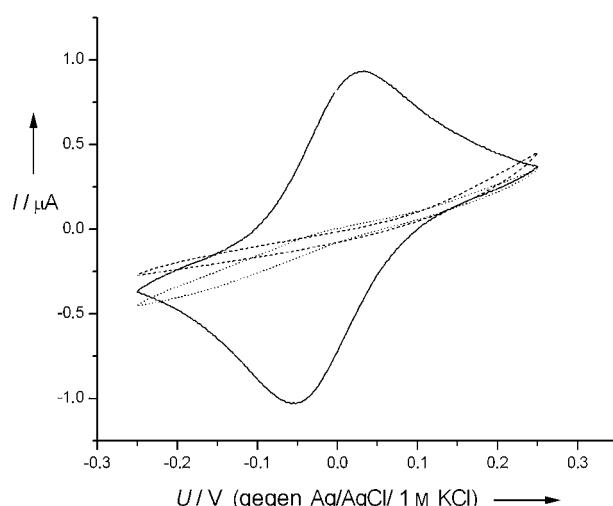


Abbildung 3: Cyclovoltammogramme von Multischichtelektroden mit Apo-Cyt.c (Apo). Durchgezogene Linie: MUA/MU-Cyt.c-(PASA/Apo) $_4$ -(PASA/Cyt.c) $_4$; gestrichelt: MUA/MU-Cyt.c-(PASA/Apo) $_4$ -(PASA/Cyt.c) $_4$ kovalent durch EDC immobilisiert; gepunktet: MUA/MU-Cyt.c-(PASA/Apo) $_{12}$ -(PASA/Cyt.c) $_4$.

Wechselwirkung zwischen der Elektrode und den Cyt.c-Schichten leistet – würden die Elektronen über den Polyelektrolyt transportiert, dürfte der Elektronentransfer durch den Einbau des elektrochemisch inaktiven Apo-Cyt.c nicht vollständig unterbunden werden. Der Elektronentransfer über vier Schichten Apo-Cyt.c kann durch eine Multischichtstruktur in Form eines komplexen, durch Polyelektrolytketten stabilisierten Proteinnetzwerks^[10,18] erklärt werden. Der isolierende Effekt von zwölf Apo-Cyt.c-Schichten zwischen der Elektrode und den äußeren Cyt.c-Schichten blieb mehrere Stunden stabil. Daher ist nicht anzunehmen, dass das Cyt.c während der voltammetrischen Messungen zur Elektrodoberfläche diffundieren kann und der Elektronentransfer auf diese Weise ermöglicht wird.

Der plausibelste Mechanismus des Elektronentransports in der Multischichtanordnung ist eine Redoxreaktion zwischen Cyt.c-Molekülen mit zwei gegenüberliegenden exporierten Hämgruppen. Dieser Mechanismus erfordert eine hohe Flexibilität der Moleküle bei der Neuausrichtung zum jeweils nächsten Reaktionspartner. Eine solche Rotationsflexibilität wurde bei Cyt.c-Adsorptionsschichten bereits beobachtet^[19] und könnte auch ein Grund für die erhöhte Elektronentransfersgeschwindigkeit sein, wenn die Mobilität von Cyt.c durch Komplexbildung an einer modifizierten Elektrode eingeschränkt wurde.^[20]

Wir haben hier eine neue Methode zur Immobilisierung von Cyt.c auf Elektroden in einer Polyelektrolyt-Protein-Architektur vorgestellt. Die elektroaktive Proteinmenge nimmt mit steigender Zahl der Cyt.c-Schichten (1–15 Schichten) fast linear zu. Eine so signifikante Zunahme an elektroaktivem Protein wurde – nach unserem Wissen – in einem System mit dem Protein als integralem Bestandteil der Multischichtarchitektur sowie mediatorfreiem Elektronentransfer noch nicht gezeigt. Bisher beschriebene Multischichtsysteme mit Myoglobin sind auf rauen Oberflächen, Nanopartikel und eine nicht natürliche Funktionsweise dieses

Proteins (Elektronentransfer anstelle von Transportfunktion) angewiesen.^[21,22] In der Biosensorik,^[17] wo Cyt.c-Elektroden bereits erfolgreich für die Quantifizierung von Sauerstoffradikalen verwendet werden, sollten Multischichtsensoren mit einer größeren Menge an elektroaktivem Cyt.c eine deutlich höhere Empfindlichkeit aufweisen. Mit dem effizienten reproduzierbaren Elektronentransfer über mehrere Schichten könnte man außerdem biologische, über Cyt.c verlaufende Elektronentransfersysteme simulieren. Dies könnte zu künstlichen Modellen für biologische Redoxsysteme und zur Entwicklung bioelektronischer Bauelemente führen.

Eingegangen am 5. September 2003,
veränderte Fassung am 26. Mai 2004 [Z52804]

Stichwörter: Cyclovoltammetrie · Cytochrome · Elektronentransfer · Hämproteine · Oberflächenplasmonenresonanz

-
- [1] I. Willner, E. Katz, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1230; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1180.
 - [2] T. Sagara, K. Niwa, A. Sone, C. Hinnen, K. Niki, *Langmuir* **1990**, *6*, 254.
 - [3] M. J. Eddowes, H. A. O. Hill, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4461.
 - [4] M. J. Tarlov, E. F. Bowden, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1847.
 - [5] M. Fedurco, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *209*, 263.
 - [6] S. Song, R. A. Clark, E. F. Bowden, M. J. Tarlov, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 6564.
 - [7] T. Daido, T. Akaike, *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *344*, 91.
 - [8] P. Bianco, J. Haladin, *Electrochim. Acta* **1994**, *39*, 911.
 - [9] Z. Q. Feng, Sh. Imabayashi, T. Kakiuchi, K. Niki, *J. Electroanal. Chem.* **1995**, *394*, 149.
 - [10] G. Decher, *Science* **1997**, *277*, 1232.
 - [11] Y. Lvov, H. Möhwald, *Protein Architecture: Interfacing Molecular Assemblies and Immobilization Biotechnology*, Marcel Dekker, New York, **1999**.
 - [12] V. Panchagnula, C. V. Kumar, J. F. Rusling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12515.
 - [13] Y. M. Lvov, Z. Q. Lu, J. B. Schenkman, X. L. Zu, J. F. Rusling, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4073.
 - [14] P. Rilling, T. Walter, R. Pommersheim, W. Vogt, *J. Membr. Sci.* **1997**, *129*, 283.
 - [15] L. W. Wang, N. F. Hu, *Bioelectrochemistry* **2001**, *53*, 205.
 - [16] A. El Kasmi, J. M. Wallace, E. F. Bowden, S. M. Binet, R. J. Lindermann, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 225.
 - [17] B. Ge, F. Lisdat, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *454*, 53.
 - [18] Sh. Liu, D. G. Kurth, B. Bredenkötter, D. Vollmer, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12279.
 - [19] A. Avila, B. W. Gregory, K. Niki, T. M. Cotton, *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 2759.
 - [20] J. Wei, H. Liu, A. R. Dick, H. Yamamoto, Y. He, D. H. Waldeck, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9591.
 - [21] H. Ma, N. Hu, J. F. Rusling, *Langmuir* **2000**, *16*, 4946.
 - [22] Y. Lvov, B. Munge, O. Giraldo, I. Ichinose, S. L. Suib, S. F. Rusling, *Langmuir* **2000**, *16*, 8850.
-