

In-situ-Abbildung einzelner Enzym-Moleküle unter elektrochemischen Bedingungen**

Claudia Baier und Ulrich Stimming*

Elektrochemische Untersuchungen von Redoxenzymen haben sich zu einem wichtigen Forschungsgebiet entwickelt, da ihre Redoxeigenschaften sie als geeignete Kandidaten für Biosensoren und bioelektrische Nanobauteile auszeichnen.^[1] Fragen zur Oberflächenbedeckung, zur Orientierung der Enzyme auf der Oberfläche, insbesondere der Position des aktiven Zentrums, und zur Aktivität einzelner Enzyme sind nach wie vor nicht vollständig geklärt, da diese Größen nicht mithilfe von integralen elektrochemischen Messmethoden wie der Cyclovoltammetrie (CV) bestimmt werden können. Rastersondenverfahren, vor allem die Rastertunnelmikroskopie unter elektrochemischen Bedingungen (EC-STM),^[2,3] sind aber ausreichend leistungsfähig, die Struktur und die Reaktivität einzelner Enzyme zu messen.^[4-6] Allerdings bestehen experimentelle Einschränkungen; um eine Schädigung der Enzymstruktur zu vermeiden, dürfen beispielsweise nur kleine Tunnelströme angelegt werden. Demnach ist eine Messmethode wie die scanning electrochemical potential microscopy (SECPM), die das Potential der Probe unter stromlosen Bedingungen ($I=0$) misst, für solche Untersuchungen potenziell von Vorteil. Der Aufbau bei SECPM ähnelt demjenigen bei EC-STM, allerdings wird die Spitze als Potentialsensor genutzt. Dabei wird der Potentialunterschied zwischen Spalte und Arbeitselektrode über einen hochohmigen Potentialverstärker gemessen und dient als Rückkopplungssignal im x - y -Rastermodus. Zudem bietet SECPM die Möglichkeit, die Potentialverteilung der Grenzfläche in x - z -Richtung, also senkrecht zur Elektrodenoberfläche, aufzunehmen. Nach der Gouy-Chapman-Stern-Theorie hat jede Elektrode an der Elektroden-Elektrolyt-Grenzfläche eine elektrochemische Doppelschicht (EDL), deren Potential mit dem Abstand senkrecht zur Elektrode abnimmt und somit mit SECPM detektiert werden kann.^[7]

2004 gelang es Woo et al.,^[8] das lokale Potentialprofil einer Au(111)-Elektrode in 1 mm NaBF₄ zu messen, indem sie die Spalte eines Eigenbau-EC-STM-Instruments senkrecht zur Oberfläche, d.h. in x - z -Richtung, bewegten. Hurth et al.^[9]

führten ähnliche Messungen durch, um den Einfluss des Oberflächenpotentials und der Elektrolytkonzentration auf das Doppelschichtprofil einer Platinfolie in KCl zu untersuchen. Corbella et al.^[10] nutzten diese Methode erstmals in einem Modus mit konstantem Potential (constant potential mode) zur Bestimmung der Verteilung von Wolfram in Schichten von diamantähnlichem Kohlenstoff, indem sie die Probenoberfläche in x - z -Richtung abbildeten. Die hier aufgeführten Beispiele sind unseres Wissens bisher die einzigen Publikationen zu dieser Technik.

SECPM zeigt ein großes Potenzial vor allem für die elektrochemische Untersuchung von Elektrodenoberflächen mit organischen und biologischen Adsorbaten. Die hier vorgestellte Arbeit macht deutlich, dass Constant-Potential-Mode-SECPM zur Abbildung einzelner adsorbierten Enzyme genutzt werden kann. Dabei zeigen In-situ-Untersuchungen von Enzymen verschiedener Größe, unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung und mit verschiedenen elektrochemischen Eigenschaften, dass SECPM Biomoleküle in einer noch nie dagewesenen Auflösung darstellen kann. Der direkte Vergleich von SECPM- und EC-STM-Aufnahmen macht deutlich, dass eine potentiometrische Technik wie SECPM durchaus von Vorteil sein kann, um Enzyme an der Fest-flüssig-Grenzfläche abzubilden, und somit eine Untersuchung ihres dynamischen Verhaltens an der Oberfläche ermöglichen könnte.

Wie in allen Rastersondenverfahren muss die Spaltenpräparation den speziellen Anforderungen der Messtechnik angepasst werden. Da die Änderung der Potentialverteilung senkrecht und parallel zur Oberfläche unterschiedlich ist, sollte die Geometrie der SECPM-Spitze auf den verwendeten Rastermodus abgestimmt sein, weil sie maßgeblich für die Auflösung ist. Für die x - z -Richtung ist eine Spalte mit geringer Ausdehnung entlang der z -Achse (Δz) vorteilhaft, für das Abbilden in x - y -Richtung hingegen eine scharfe Spalte (kleines Δx , Δy) wie bei STM.

Weiterhin stellt die metallische SECPM-Spitze ebenfalls eine Elektrode mit elektrochemischer Doppelschicht an der Fest-flüssig-Grenzfläche dar. Nähert sich nun die Spalte der Arbeitselektrode, überlappen die beiden Doppelschichten. Auch hier muss wieder zwischen x - z - und x - y -Modus unterschieden werden: Bewegt man die Spalte in x - z -Richtung auf die Oberfläche zu, wird das Potential der Spalte zunehmend von den überlappenden EDLs bestimmt. Mithilfe eines Modells zweier überlappender Doppelschichten von identischen Metallen, die beide der Gouy-Chapman-Theorie folgen, ist es möglich, die Potentiale zu trennen und die EDL der Elektrodenoberfläche zu berechnen.^[11]

Im x - y -Modus können die Einflüsse zweier überlappender EDLs während der Abbildung als nahezu konstant angesehen

[*] C. Baier, U. Stimming

Physik Department E19, Technische Universität München
James-Franck-Straße 1, 85748 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2891-2530
E-Mail: stimming@ph.tum.de

[**] Die Autoren danken Dr. Jörg Eppinger für die Hilfe bei der Simulation des Oberflächenpotentials von Meerrettichperoxidase. Diese Arbeit wurde unterstützt von der International Graduate School Materials Science of Complex Interfaces (Compint) im Elitenetzwerk Bayern und der Max-Buchner-Forschungsstiftung (DECHEMA).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200806144> zu finden.

werden. Auch hier ist eine Trennung möglich. Zusätzliche Informationen zum Einfluss der Spitze befinden sich in den Hintergrundinformationen.

Das Eisenspeicherprotein Ferritin und die eisenfreie Form Apoferritin haben eine geordnete 3D-Struktur aus 24 Untergruppen, die eine kugelförmige Proteinhülle mit 12 nm Durchmesser bilden. Während jedes Ferritin rund 4500 Fe^{III}-Ionen in Form von 8FeO(OH)-FeO(H₂PO₄)₃-Kristalliten in einem bis zu 8 nm großen Kern speichern kann,^[12] besteht Apoferritin lediglich aus der leeren Proteinhülle.^[13] Abbildung 1 zeigt zwei Ferritin-Moleküle adsorbiert an Liniende-

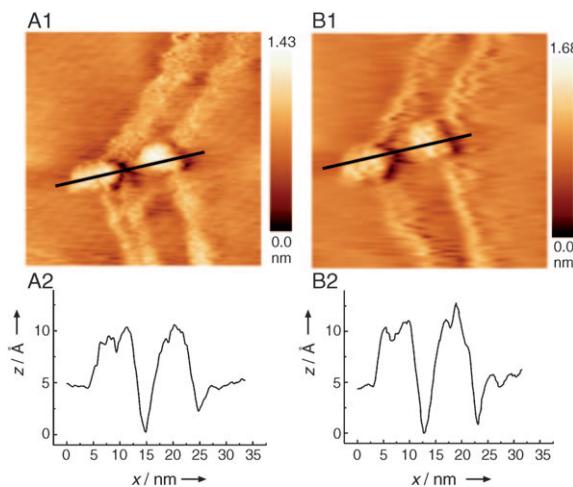


Abbildung 1. A1) EC-STM-Aufnahme und B1) SECPM-Aufnahme von Ferritin auf einer HOPG-Elektrode (40 nm×40 nm) mit dazugehörigen Linienprofilen (A2) und (B2).

fekten einer anoxidierten HOPG-Oberfläche (HOPG: hoch orientierter pyrolytischer Graphit), aufgenommen in 10 mM Phosphatpufferlösung (PBS) mit Constant-Current-Mode-EC-STM (Abbildung 1A1; $U_{\text{Bias}} = 0.1 \text{ V}$, $I_T = 0.5 \text{ nA}$) und mit Constant-Potential-Mode-SECPM (Abbildung 1B1; $\Delta U = 5 \text{ mV}$). Beide Abbildungen zeigen eine ähnliche Form der Moleküle mit einem Durchmesser von 7.5 nm (linkes Enzym) und 6.9 nm (rechtes Enzym) und einer Höhe von 0.5 nm bezüglich der HOPG-Oberfläche (Linienprofile in Abbildung 1A2 bzw. B2). Bei STM-Messungen, insbesondere beim Abbilden von Moleküllagglomeraten, beobachtet man oftmals Artefakte, die wahrscheinlich durch Wechselwirkungen zwischen Spitz und Elektrode zustandekommen. Derselbe Elektrodenbereich kann im SECPM-Modus jedoch störungsfrei abgebildet werden.

Auch Apoferritin wurde mit SECPM und STM untersucht. SECPM konnte einzelne Moleküle (Abbildung 2A) mit einem Durchmesser von etwa 12 nm (Abbildung 2B) auflösen, wohingegen eine Untersuchung mit STM fehlgeschlug.

Ausgehend von diesen Ergebnissen machen wir folgende Annahmen:

- 1) Mit SECPM ist es möglich, die Struktur des Proteins Apoferritin mit einem Durchmesser von 12 nm darzustellen. Der schwache Bildkontrast könnte an der eher gleichmäßigen Potentialverteilung im Protein liegen;

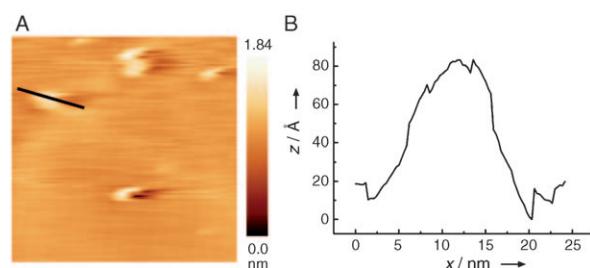


Abbildung 2. A) SECPM-Aufnahme von Apoferritin auf einer HOPG-Elektrode (90 nm×90 nm) und B) zugehöriges Linienprofil.

- 2) Mit STM ist es nicht möglich, Apoferritin abzubilden, wahrscheinlich wegen einer zu geringen Leitfähigkeit der Polypeptide des Proteins;
- 3) Mit STM und SECPM ist es möglich, Ferritin-Moleküle mit ähnlicher Auflösung abzubilden, jedoch ist der gemessene Durchmesser viel kleiner als der von Apoferritin. Wir nehmen an, dass die Leitfähigkeit (STM) und die Potentialverteilung (SECPM) der Eisenatome innerhalb der Proteinhülle des Ferritinmoleküls den Abbildungsprozess bestimmen und daher die Eigenschaften der Proteinhülle selbst überlagern.

Im Unterschied zu Ferritin enthält das Redoxenzym Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) nur ein Eisenatom, das sich im aktiven Zentrum, der Hämgruppe,^[14] befindet. Einzelne HRP-Moleküle wurden in 10 mM PBS mit SECPM aufgenommen (Abbildung 3A; $\Delta U = 5 \text{ mV}$). Alle fünf sichtbaren Moleküle haben die Struktur

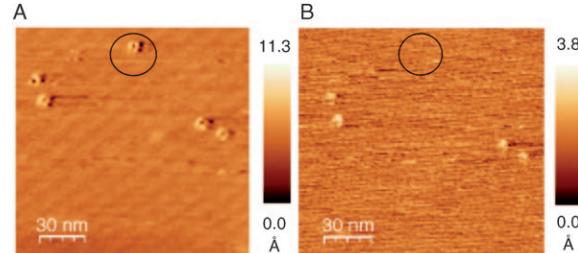


Abbildung 3. A) SECPM-Aufnahme und B) EC-STM-Aufnahme von HRP auf einer HOPG-Elektrode.

eines offenen Rings mit durchschnittlichen Abmessungen von $54 \times 52 \times 3.2 \text{ Å}^3$. Der gleiche Bereich wurde auch mit STM untersucht (Abbildung 3B; $U_{\text{Bias}} = 0.1 \text{ V}$, $I_T = 0.5 \text{ nA}$). Die vier hellen Punkte stellen einzelne Moleküle mit den Dimensionen $43 \times 34 \times 2.4 \text{ Å}^3$ dar.

Vergleicht man die STM- und SECPM-Bilder, so konnten die Moleküle mit SECPM deutlich detaillierter aufgelöst werden. Des Weiteren kann im SECPM-Modus im oberen Bildabschnitt ein zusätzliches HRP-Molekül beobachtet werden (Abbildung 3A, schwarzer Kreis), das im STM-Bild nicht sichtbar ist. Ein schlechter elektrischer Kontakt zwischen Enzym und Elektrode unterdrückt bei STM eventuell den Elektronenübergang zur Spitz und verhindert so das Abbilden der Moleküle. Da SECPM nur die Ladungsverteilung darstellt, ist hier kein Elektronenübergang nötig.

Zusätzlich ist die STM-Auflösung relativ gering, vor allem sind die Abmessungen der Moleküle kleiner als von Zhang et al.^[4] berichtet, deren Angaben auf Ex-situ- und In-situ-STM-Untersuchungen auf HOPG mit $I_T = 0.5\text{--}1.2 \text{ nA}$ beruhen ($62 \times 43 \times 12 \text{ \AA}^3$ bzw. $68 \times 44 \times 40 \text{ \AA}^3$). Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung könnte wiederum ein schlechter Kontakt des Enzyms zur Substratoberfläche sein, was möglicherweise die Qualität der STM-Aufnahme verschlechtert. Weiterhin müssen Beeinträchtigungen durch das Eindringen der Spitze in Teile des Moleküls berücksichtigt werden. Es ist zu beachten, dass bei STM mit einem Tunnelstrom von 0.5 nA ca. 10^9 Elektronen pro Sekunde durch das Molekül fließen – also ein Elektron pro Nanosekunde. Dies könnte sich nicht nur negativ auf die Bildqualität, sondern auch auf die Proteinstruktur auswirken.

Die 3D-Darstellung der SECPM-Aufnahme von zwei Molekülen (Abbildung 4 A) macht die offene Ringstruktur deutlich sichtbar. In Abbildung 4 B ist das zugehörige Hö-

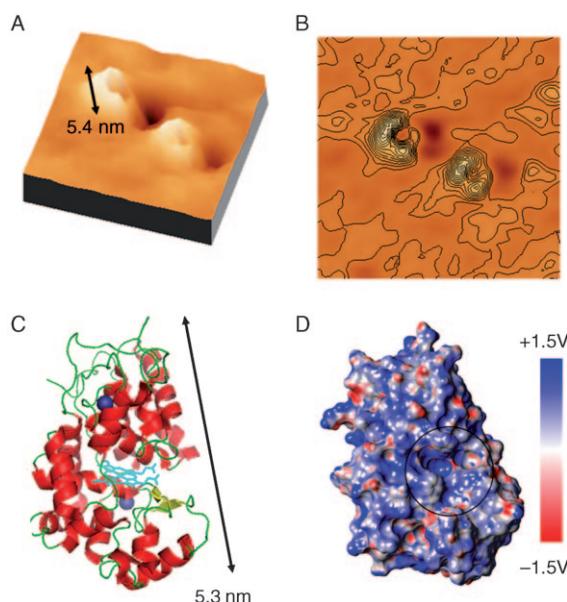


Abbildung 4. A) 3D-SECPM-Aufnahme von adsorbiertem HRP auf HOPG (Vergrößerung von Abbildung 3 A). B) Höhenprofil für (A), $45 \text{ nm} \times 45 \text{ nm}$, 10 Höhenlinien mit 0.27 \AA nm^{-1} . C) 3D-Darstellung der Röntgenstruktur von HRP. Die Hämgruppe ist in Türkis, die Calciumatome in Blau, die α -Helices in Rot und die β -Faltblatt-Bereiche sind in Gelb dargestellt (PyMOL^[16]-Bild, PDB-Zugangscode 1w4w.^[17]). D) Oberflächenpotential eines HRP-Moleküls in 10 mM PBS (pH 7), simuliert mit YASARA.^[15]

henprofil dargestellt. Jede Linie steht für eine konstante Höhe, die Linienabstände beschreiben einen Höhenunterschied von 0.27 \AA . Ausgehend von kristallographischen Röntgenuntersuchungen kann gefolgert werden, dass sich die Hämgruppe in der Tasche zwischen Nah- und Fernbereich des Moleküls befindet (Abbildung 4 C).^[14] Vergleicht man die 3D-Darstellung und die Röntgenstruktur, so könnte man annehmen, dass die durch SECPM dargestellte Ringstruktur zu der Aussparung in der Proteinhülle passt, in der das aktive

Zentrum des Enzyms sitzt. Um die SECPM-Aufnahmen mit der Ladungsverteilung zu vergleichen, wurde das elektrostatische Oberflächenpotential eines in 10 mM PBS (pH 7, $T = 298 \text{ K}$) inkubierten HRP-Moleküls mit YASARA simuliert (Abbildung 4 D).^[15] Das Potentialdiagramm ermöglicht einen qualitativen Vergleich mit den SECPM-Daten. Die Position des aktiven Zentrums in der Proteintasche kann ebenfalls im Potentialprofil (Abbildung 4 D, schwarzer Kreis) identifiziert werden, genau wie in der SECPM-Aufnahme (Abbildung 4 A und 4 B).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass SECPM eine vielversprechende Technik zur Darstellung der Ladungsverteilung von adsorbierten Molekülen ist. Einzelne HRP-Moleküle können mit hoher Auflösung abgebildet werden. Da das lokale Potential in der Doppelschichtregion gemessen wird und zwischen Spalte und Probe faktisch kein Strom fließt, glauben wir, dass SECPM über ein großes Potenzial verfügt, um einzelne Moleküle in ihrer natürlichen Umgebung und unter Reaktionsbedingungen zu untersuchen. Die Möglichkeit, lokale Reaktivitätsmessungen in Abhängigkeit vom Oberflächenpotential durchzuführen, könnte nicht nur neue Perspektiven in der Elektrokatalyse von Redoxenzymen eröffnen, sondern auch Lösungsansätze für viele Probleme von elektrochemischen Studien an Oberflächen unter In-situ-Bedingungen anbieten.

Eingegangen am 17. Dezember 2008,
veränderte Fassung am 2. April 2009
Online veröffentlicht am 24. Juni 2009

Stichwörter: Bioelektrochemie · Enzyme · Nanotechnologie · Oberflächenchemie · Rastersondenverfahren

- [1] A. Alessandrini, M. Salerno, S. Frabboni, P. Facci, *Appl. Phys. Lett.* **2005**, *86*, 133902.
- [2] R. Sonnenfeld, P. K. Hansma, *Science* **1986**, *232*, 211.
- [3] K. Itaya, E. Tomita, *Surf. Sci.* **1988**, *201*, L507.
- [4] J. D. Zhang, Q. J. Chi, S. J. Dong, E. K. Wang, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1996**, *39*, 267.
- [5] M. Wang, S. Bugarski, U. Stimming, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 5165.
- [6] M. Wang, S. Bugarski, U. Stimming, *Small* **2008**, *4*, 1110.
- [7] A. J. Bard, W. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, Weinheim, **2001**.
- [8] D. H. Woo, J. S. Yoo, S. M. Park, I. C. Jeon, H. Kang, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2004**, *25*, 577.
- [9] C. Hurth, C. Z. Li, A. J. Bard, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 4620.
- [10] C. Corbella, E. Pascual, G. Oncins, C. Canal, J. L. Andujar, E. Bertran, *Thin Solid Films* **2005**, *482*, 293.
- [11] C. Baier, W. Schmickler, U. Stimming, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [12] R. R. Crichton, *Angew. Chem.* **1973**, *85*, 53–62; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1973**, *12*, 57–65.
- [13] R. R. Crichton, *FEBS Lett.* **1973**, *34*, 125.
- [14] N. C. Veitch, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 249.
- [15] E. Krieger, T. Darden, S. Nabuurs, A. Finkelstein, G. Vriend, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2004**, *57*, 678.
- [16] W. L. DeLano, De Lano Scientific, Palo Alto, CA, USA **2002**.
- [17] „Protein Data Bank“: H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235.