

Kombinierte elektrochemische und oberflächenverstärkte IR-absorptionsspektroskopische Untersuchung von Gramicidin A in trägerfixierten Lipiddoppelschichtmembranen**

Jacek Kozuch, Claudia Steinem, Peter Hildebrandt* und Diego Millo*

Membranproteine üben eine Vielzahl biologischer Funktionen aus, z.B. beim Elektronen- und Protonentransfer, der spannungsabhängigen Translokation von Ionen und bei verschiedenen enzymatischen Umwandlungen. Da die meisten dieser Prozesse mit elektrochemischen Methoden beobachtet und kontrolliert werden können, wurden verschiedene Strategien entwickelt, Membranproteine unter Erhalt ihrer natürlichen Funktion zu immobilisieren.^[1–4] Trägerfixierte Membranen eignen sich besonders gut, da ihre Architektur die Einbettung von funktionellen Proteinen auf Elektroden erlaubt.^[4–8] Ein Ansatz beruht dabei auf der Anbindung eines solubilisierten Proteins über einen His-Tag an eine auf geeignete Weise funktionalisierte Metalloberfläche, gefolgt von der Rekonstitution der Lipiddoppelschicht um das fixierte Protein durch Austausch des Detergens durch Lipidmoleküle.^[5] Allerdings ist in solchen proteingebundenen Lipiddoppelschichten, insbesondere auf nicht idealen Oberflächen, sowohl die Mobilität der Proteine als auch die Stabilität des Konstrukts stark eingeschränkt. Einen besseren und universelleren Ansatz bieten lipidgebundene Lipiddoppelschichtmembranen (tBLMs, tethered bilayer lipid membranes),^[4–8] die aus einer an die Elektrode kovalent gebundenen selbstorganisierten Monolage (SAM, self-assembled monolayer) amphiphiler Moleküle und einer sich darauf befindlichen Lipidschicht bestehen. Letztere entsteht durch Fusion unilamellarer Vesikel. Solche tBLMs erlauben auch



Abbildung 1. Schematische Darstellung der tBLM mit inkorporiertem Gramicidin A (gA) auf einer nanostrukturierten Goldelektrode. Die tBLM besteht aus einer 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (POPC)-Schicht auf einer Monolage aus (Cholesteryl)polyethylenoxythiol (CPEO3) und 6-Mercaptohexanol (6MH).

die Einfügung integraler Membranproteine (Abbildung 1)^[6,7] und ahmen auf diese Weise die natürliche Umgebung sowohl hinsichtlich der Architektur als auch der exzellenten elektrischen Eigenschaften nach und zeichnen sich durch ihre Langzeitstabilität aus.

Bislang ist die elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS) die bevorzugte elektrochemische Methode, um die Bildung von tBLMs zu verfolgen und die Funktion von inkorporierten Membranproteinen, insbesondere Ionenkanälen,^[8] zu untersuchen. Leider liefert die EIS weder Informationen über die Struktur der tBLMs noch des eingebetteten Proteins, was den dringenden Bedarf an geeigneten spektroskopischen Techniken begründet. Bislang wurde in diesem Zusammenhang die Infrarot(IR)-Spektroskopie allerdings nur zur Untersuchung von reinen tBLMs oder tBLMs mit peripher gebundenen Proteinen ohne Kontaktierung mit einer Trägerelektrode eingesetzt.^[6,9] Ein elektrochemisch-spektroskopischer Ansatz, der es erlaubt, Funktion und Struktur von tBLM-gebundenen integralen Proteinen an demselben System in situ zu untersuchen, wurde bis heute noch nicht etabliert.

Hier berichten wir über die Kombination von EIS und oberflächenverstärkter Infrarotabsorptionsspektroskopie (SEIRA, surface-enhanced infrared absorption) in einer elektrochemischen Zelle. Der Ansatz nutzt die verstärkte IR-Absorption der Moleküle, die sich in unmittelbarer Nähe zu einer nanostrukturierten Au-Schicht befinden. Ein solcher Au-Film wird dabei auf einem Si-Prisma, das als optisches Element im abgeschwächten Totalreflexionsmodus verwendet wird, abgeschieden^[10] und dient als Signalverstärker sowie als Arbeitselektrode in einem elektrochemischen Aufbau. Auf diese Weise können Elektrochemie und Spektroskopie an derselben Probe angewendet werden. Aufgrund der SEIRA-Auswahlregel erhält man besonders starke Signale von IR-Moden mit einer Dipolmomentänderung senkrecht

[*] J. Kozuch, Prof. Dr. P. Hildebrandt
Institut für Chemie, Sekr. PC14, Technische Universität Berlin
Straße des 17. Juni 135, 10623 Berlin (Deutschland)
E-Mail: hildebrandt@chem.tu-berlin.de

Dr. D. Millo
Biomolecular Spectroscopy/LaserLaB Amsterdam
Vrije Universiteit Amsterdam
De Boelelaan 1083, 1081 HV Amsterdam (Niederlande)
E-Mail: dmillo@vu.nl

Prof. Dr. C. Steinem
Institut für Organische und Biomolekulare Chemie
Universität Göttingen
Tammannstraße 2, 37077 Göttingen (Deutschland)

[**] Die Autoren danken Lars J. C. Jeuken für hilfreiche Diskussionen. Diese Arbeit wurde von der DFG (Exzellenzcluster „UniCat“, P.H.; SFB 803, C.S.), der Alexander-von-Humboldt-Stiftung (D.M.) und der Netherlands Organisation for Scientific Research (NWO) (722.011.003, D.M.) gefördert. J.K. dankt der BIG-NSE für ein Stipendium und C.S. der Brain Sustain Initiative der Universität Göttingen für die Bewilligung eines Forschungsjahres sowie J. Gerber-Nolte für technische Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201203214> zu finden.

zur Metalloberfläche. Außerdem können Beiträge aus der Lösung aufgrund der Entfernungsabhängigkeit der Verstärkung vernachlässigt werden. Bislang wurde SEIRA-Spektroskopie zur Charakterisierung peripherer und integraler Membranproteine eingesetzt, die auf chemisch modifizierten Oberflächen, wie z.B. proteingebundenen Lipiddoppelschichten, aufgebracht wurden.^[11,12]

Als Modell für ein Membranprotein wurde Gramicidin A (gA) verwendet, das als lineares Polypeptid verschiedene rechtshändige β -helicale Strukturen in Membranen bildet.^[13,14] Die $\beta^{6,3}$ -Spezies steht dabei für die membranumspannende Kopf-an-Kopf-Konformation, die in der Lage ist, monovalente Ionen durch die Membran zu transportieren. Das Ausmaß der Leitfähigkeit ist durch die Größe und Ladung des Ions bedingt und folgt der Hofmeister-Serie, wobei Anionen nicht transportiert werden und zweiwertige Kationen den Kanal blockieren.

Es wurde zunächst eine Monolage aus (Cholesteryl-polyethylenoxy)thiol (CPEO3) und 6-Mercaptohexanol (6MH) im molaren Verhältnis 1:1 (in Lösung) an die Au-Elektrode gebunden.^[15,16] Die Bildung der tBLM erfolgte durch Zugabe von frisch präparierten unilamellaren Vesikeln aus 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC) (3–4 h; Hintergrundinformationen). Vor der Inkubation mit gA wurde die Pufferlösung gegen einen Cs^+ -haltigen Puffer ausgetauscht, wodurch der leitende Zustand des eingebetteten gA bevorzugt gebildet wird.^[13]

Abbildung 2 zeigt die Impedanzspektren der gemischten SAM und der tBLM. Alle Spektren weisen aufgrund der nanostrukturierten Oberfläche zwei Dispersionen auf, die unterhalb von 10 Hz und im Frequenzbereich von 10 bis 1000 Hz zu finden sind. Die niederfrequente Komponente charakterisiert die molekularen Abstandhalter der SAMs, d.h. der 6MH-Moleküle und der Polyethylenoxy-Kette des CPEO3 (Hintergrundinformationen), während die hochfrequente Komponente die elektrischen Eigenschaften der Cholesterylkopfguppen bzw. die Lipiddoppelschicht be-

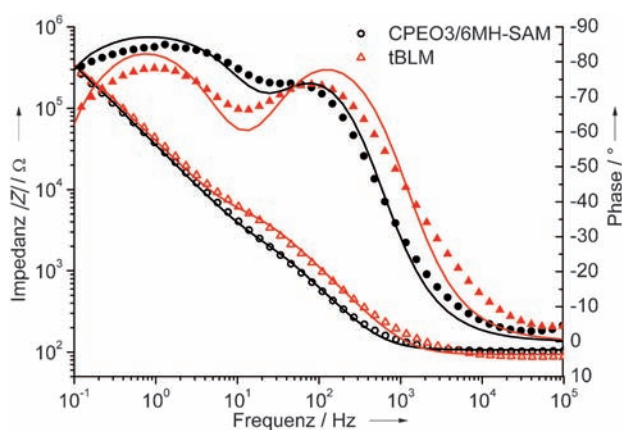


Abbildung 2. EIS-Spektren der CPEO3/6MH-Monolage (schwarze Kreise) und der tBLM nach dem Spreiten der POPC-Vesikel (rote Dreiecke) (volle Symbole beziehen sich auf den Phasenwinkel und leere auf den Betrag der Impedanz). Die Kurven repräsentieren das Ergebnis des angepassten Ersatzschaltkreises $R_{\text{Solution}}(R_{\text{Spacer}}C_{\text{Spacer}})(R_{\text{Bilayer}}C_{\text{Bilayer}})$ (Puffer: 20 mM Tris, pH 7.4, 100 mM NaCl).

schreibt. Beide Komponenten können durch das Ersatzschaltbild $R_{\text{Solution}}(R_{\text{Spacer}}C_{\text{Spacer}})(R_{\text{Bilayer}}C_{\text{Bilayer}})$, welches an die Impedanzdaten angepasst wurde, angenähert werden. Die Kapazität der gesamten tBLM berechnet sich aus der Summe der reziproken Kapazitäten C_{Spacer} und C_{Bilayer} (Hintergrundinformationen). Für die gemischte SAM erhält man damit eine spezifische Kapazität von $1.55 \mu\text{F cm}^{-2}$, die im Falle der tBLM auf $0.86 \mu\text{F cm}^{-2}$ sinkt. Dieser Wert vergleicht sich gut mit den Werten früherer Arbeiten und entspricht der Bildung der tBLM.^[17] Der im Vergleich zu planaren Au-Oberflächen geringere Membranwiderstand kann durch eine erhöhte Anzahl von Defekten aufgrund der Rauigkeit der nanostrukturierten Elektrode erklärt werden.^[18] Der Austausch der Na^+ -Pufferlösung gegen eine Cs^+ -haltige Lösung hat selbst nach intensivem Spülen keinen Einfluss auf die elektrischen Eigenschaften, was die hohe Stabilität der tBLM belegt. Die anschließende Inkorporation von gA resultiert in einem Anstieg der Kapazität auf $0.96 \mu\text{F cm}^{-2}$,^[15] was auf die Verdünnung der Membran oder den Austausch der Lipidmoleküle durch das Peptid zurückgeführt werden kann (Hintergrundinformationen).

Die Bildung der tBLM durch Spreiten und Fusionieren der Vesikel auf der gemischten Monolage wurde mithilfe der SEIRA-Spektroskopie verfolgt. Für die in Abbildung 3 ge-

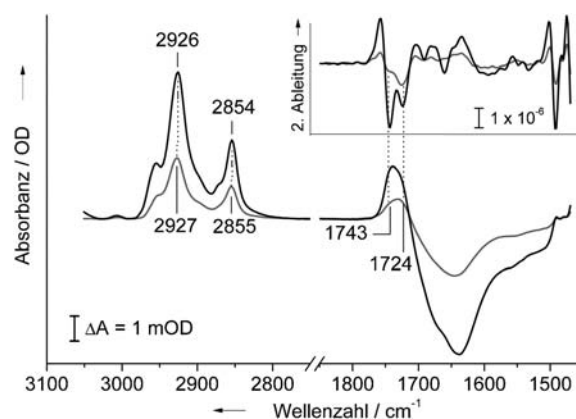


Abbildung 3. SEIRA-Spektren während des Spreitens der POPC-Vesikel nach 3 min (grau) bzw. 3 h (schwarz) Inkubation (bezogen auf das SEIRA-Spektrum der gemischten SAM). Einschub oben rechts: zweite Ableitungen der jeweiligen Spektren (Puffer: 20 mM Tris, pH 7.4, 100 mM NaCl).

zeigten Spektren wurde das Spektrum der SAM als Referenz verwendet. Auf diese Weise können positive und negative Beiträge adsorbierten bzw. von der Elektrode entfernten Spezies zugeordnet werden. Die positiven Banden zwischen 2800 und 3050 cm^{-1} und bei 1733 cm^{-1} resultieren aus den C-H- bzw. der C=O-Schwingung der Estergruppe der POPC-Moleküle. Die breite negative Bande bei 1645 cm^{-1} spiegelt die Desorption der in SAM-Nähe befindlichen Wassermoleküle wider, die durch die Phospholipide verdrängt wurden. Während der tBLM-Bildung sind nur geringfügige Bandenverschiebungen in der C-H-Schwingungsregion zu erkennen, die nicht von Änderungen der relativen Intensitäten begleitet werden. Die C=O-Schwingung dagegen zeigt eine erhebliche

zeitabhängige Änderung der Position und der relativen Intensität. Diese Entwicklung wird in der zweiten Ableitung der Spektren (Abbildung 3) deutlicher und weist auf die Existenz zweier unterschiedlicher POPC-Komponenten in der tBLM hin. Während zu Beginn der Vesikelfusion die C=O-Schwingungsregion durch eine Bande bei 1724 cm^{-1} dominiert wird, herrscht am Ende des Prozesses eine zweite Bande bei 1743 cm^{-1} vor. Die kinetische Analyse der jeweiligen Intensitätsänderungen ergibt Anstiegszeiten von 2 (1724 cm^{-1}) und 480 min (1743 cm^{-1} , Hintergrundinformationen) und lässt einen zweistufigen Prozess der tBLM-Bildung auf der CPEO3/6MH-Monolage vermuten. Dabei kommt es zunächst zu einem schnellen Spreiten und Fusionieren der POPC-Vesikel auf der Monolage, gefolgt von einer langsameren Reorientierung der Phospholipidmoleküle, die zum Schließen der Lücken in der gemischten Monolage führt. Letzteres könnte einen „Flip-over“-Prozess der Lipide beinhalten, bei dem die Kopfgruppen, ursprünglich in Richtung Lösung zeigend, sich zur Elektrodenoberfläche hin orientieren. Die C=O-Schwingung bei 1724 cm^{-1} entspricht hierbei aufgrund der niedrigeren Frequenz der lösungsexponierten (wasserstoffbrückegebundenen) oberen Schicht und die Bande bei 1743 cm^{-1} der eingebetteten, der Elektrode zugewandten unteren Schicht.

Die Inkorporation von gA führt zu einer schwachen negativen Bande bei 1741 cm^{-1} , die aus der Verdrängung einiger POPC-Moleküle durch das Peptid resultiert (Abbildung 4). Die Frequenz ist leicht gegenüber der POPC-Komponente bei 1743 cm^{-1} verschoben, was durch den Na^+ - Cs^+ -Austausch in der Lösung und die mit der Zeit dichter werdende Lipidpackung erklärt werden kann.^[19] Die Amid-I- und Amid-II-Moden des Peptids treten bei 1629 bzw. 1554 cm^{-1} auf und weisen auf das Vorliegen der $\beta^{6,3}$ -Spezies hin.^[20] Außerdem entspricht das hohe Amid I/Amid II-Intensitätsverhältnis (ca. 16) einer einheitlichen senkrechten Anordnung der β -Helix des gA in Bezug auf die Elektrodenoberfläche.^[21] Der zeitliche Verlauf der Amid-I-Bandenintensität zeigt ein biexponentielles Verhalten (Hintergrundinformationen), bei dem die schnelle Phase (7.2 min) der direkten Inkorporation von gA in die obere Lipidlage und die langsame Komponente

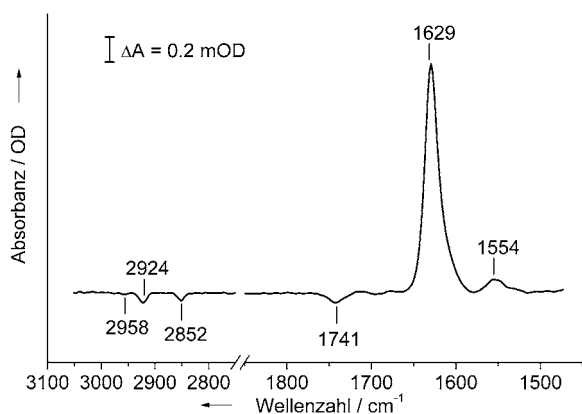


Abbildung 4. SEIRA-Spektrum der tBLM nach Inkorporation von gA (bezogen auf das SEIRA-Spektrum der reinen tBLM; Puffer: 20 mM Tris, pH 7.4, 100 mM CsCl).

(111 min) der Reorientierung des Peptids von der oberen in die untere Lipidschicht der tBLM zugeordnet werden kann.^[22]

Die funktionellen Eigenschaften von gA wurden durch die Messung von SEIRA-Differenzspektren an dem eingebetteten Peptid in Gegenwart von Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ und Tl^+ gegen die Ba^{2+} -haltige Pufferlösung als Referenz untersucht (Abbildung 5, Hintergrundinformationen). Die beobachteten Änderungen der Amid-I-Bande resultieren aus dem Austausch der an der gA-Bindungsstelle gebundenen Ba^{2+} -Ionen gegen die verschiedenen monovalenten Kationen und können somit mit dem reversiblen Anstieg des leitenden Zustands korreliert werden (positive Differenzbande zwischen 1620 und 1629 cm^{-1}). Im Falle von Na^+ , K^+ und Cs^+ kann dieser leitende Zustand der $\beta^{6,3}$ -Konformation zugeordnet werden.^[20] Abgesehen von Tl^+ , das einen ähnlichen Ionenradius wie K^+ aufweist, steigt die Frequenz der Amid-I-Bande mit der Größe des Kations. Die Diskrepanz im Falle des Tl^+ kann möglicherweise auf dessen deutlich höhere Polarisierbarkeit zurückgeführt werden, die den Charakter der gA/tBLM-Wechselwirkung beeinflusst.

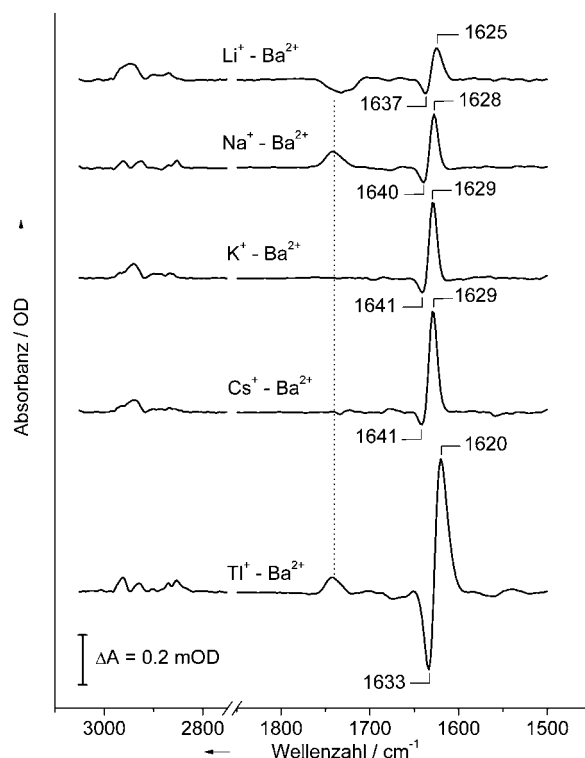


Abbildung 5. Basislinienkorrigierte SEIRA-Differenzspektren von tBLM-gebundenem gA in Gegenwart verschiedener einwertiger Kationen unter Verwendung des Ba^{2+} -Spektrums als Referenz (Puffer: 20 mM Tris, pH 7.4, 100 mM MCl_x mit $\text{M} = \text{Ba}$, Li , Na , K , Cs ; im Fall von Tl^+ wurde das Fluoridsalz verwendet). Details zur Basislinienkorrektur sind den Hintergrundinformationen zu entnehmen (Abbildung S15).

Die spektralen Unterschiede im Bereich der C=O-Schwingungen (Abbildung 5, gepunktete Linie) können entsprechend früheren Arbeiten zur Bindung von Kationen an POPC interpretiert werden.^[23,24] Demnach binden Li^+ , Na^+

und Ba^{2+} sehr stark an die POPC-Kopfgruppen, sodass der Austausch von Ba^{2+} durch Li^+ oder Na^+ zu einer beträchtlichen Differenzbande in der C=O-Schwingungsregion führt, wenn auch mit unterschiedlichem Vorzeichen. Diese negative bzw. positive Differenzbande könnte damit einer modifizierten vertikalen Auslenkung oder einem veränderten Neigungswinkel der Li^+ - bzw. Na^+ -gebundenen Lipidkopfgruppen in Bezug zur Oberfläche zugeschrieben werden. Eine entsprechende Erklärung gilt für die Ti^+ -Bindung. Dagegen schlossen frühere Arbeiten eine direkte Wechselwirkung von K^+ und Cs^+ mit den C=O-Gruppen des POPC aus.^[22,23] Dies deckt sich mit dem Fehlen von Differenzbanden in den SEIRA-Differenzspektren (Abbildung 5).

Die Verwendung von EIS an tBLM-gebundenem gA in Gegenwart verschiedener Kationen ermöglicht die Unterscheidung des leitenden Zustands (Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ und Ti^+) vom nicht-leitenden Ba^{2+} -gebundenen Zustand, der die höchste Impedanz aufweist (Abbildung 6, rechts; Hintergrundinformationen). Diese Daten lassen sich mit den Intensitäten der positiven Differenzbande in der Amid-I-Region ($1620\text{--}1629\text{ cm}^{-1}$) aus den entsprechenden Kationenaustauschexperimenten korrelieren (Abbildung 6, links). Mit Ausnahme des Impedanzbetrages im Falle von Li^+ stimmen sowohl die elektrochemischen als auch die spektroskopischen Messwerte mit der Hofmeister-Serie überein. Die Problematik im Falle des Li^+ ist wahrscheinlich auf den geringen Ionenradius zurückzuführen, wodurch Li^+ in der Lage ist, durch Defekte in der tBLM zu diffundieren und somit eine verringerte Impedanz zu bewirken.

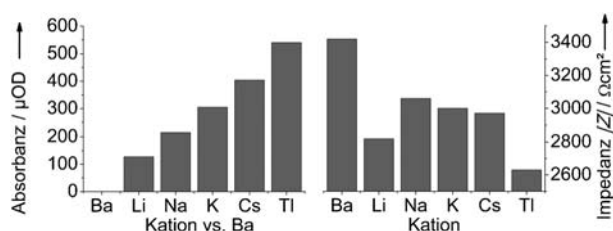


Abbildung 6. Links: Intensitäten der positiven Amid-I-SEIRA-Differenzbanden des leitenden Zustandes (Abbildung 5). Rechts: Beträge der Impedanz bei einer Frequenz von 45 Hz von tBLM-gebundenem gA in Gegenwart verschiedener Kationen. Die Fehler der Absorbanz und des Betrages der Impedanz liegen innerhalb von 10 bzw. 5%.

Zusammengefasst haben wir anhand der kombinierten Anwendung von EIS und SEIRA-Spektroskopie die erfolgreiche Konstruktion einer tBLM auf einer nanostrukturierten Au-Elektrode demonstriert. Trotz der rauen Oberflächenstruktur, die für die Oberflächenverstärkung der IR-Signale essentiell ist, zeigt die tBLM eine zufriedenstellende Impedanz (Hintergrundinformationen) sowie eine hohe mechanische und Langzeitstabilität (> 60 h). Dies sind essentielle Voraussetzungen für die strukturelle und funktionelle Cha-

rakterisierung von integrierten Proteinen in tBLMs. Die vorliegende Untersuchung von tBLM-gebundenem gA liefert neue Informationen über die Struktur und molekulare Wechselwirkungen von Kationen mit dem Peptid und der Membran und demonstriert das hohe Potential unseres Ansatzes für die Analyse der Funktion von Membranproteinen auf molekularer Ebene.

Eingegangen am 26. April 2012
Online veröffentlicht am 2. Juli 2012

Stichwörter: Elektrochemie · Lipiddoppelschichtmembranen · Gramicidin A · Ionenkanäle · SEIRA

- [1] I. Willner, E. Katz, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1230–1269; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1180–1218.
- [2] M. Ferri, F. Mazzei, T. Ferri, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 1554–1564.
- [3] A. Janshoff, C. Steinem, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 433–451.
- [4] E. K. Sinner, S. Ritz, Y. Wang, J. Dostálek, U. Jonas, W. Knoll, *Mater. Today* **2010**, *13*, 46–55.
- [5] R. L. C. Naumann, C. Nowak, W. Knoll, *Soft Matter* **2011**, *7*, 9535–9548, zit. Lit.
- [6] L. J. C. Jeuken, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1234–1240.
- [7] Y. H. Chan, S. Boxer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 581–587.
- [8] C. Steinem, A. Janshoff, H.-J. Galla, M. Sieber, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1997**, *42*, 213–220.
- [9] Y. Cheng, N. Boden, R. J. Bushby, S. Clarkson, S. D. Evans, P. F. Knowles, A. Marsh, R. E. Miles, *Langmuir* **1998**, *14*, 839–844.
- [10] F. Siebert, P. Hildebrandt, *Vibrational Spectroscopy in Life Science*, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**.
- [11] K. Ataka, J. Heberle, *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, *36*, 986–991.
- [12] D. Millo, P. Hildebrandt, M.-E. Pandelia, W. Lubitz, I. Zebger, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2680–2683; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2632–2634.
- [13] B. A. Wallace, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1990**, *19*, 127–157.
- [14] D. D. Busath, *Annu. Rev. Physiol.* **1993**, *55*, 473–501.
- [15] J. K. R. Kendall, B. R. G. Johnson, P. H. Symonds, G. Imperato, R. J. Bushby, J. D. Gwyer, C. van Berkel, S. D. Evans, L. J. C. Jeuken, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 2191–2198.
- [16] E. K. Schmitt, M. Numabi, R. J. Bushby, C. Steinem, *Soft Matter* **2008**, *4*, 250–253.
- [17] A. Erbe, R. J. Bushby, S. D. Evans, L. J. C. Jeuken, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 3515–3524.
- [18] Lit. [15].
- [19] C. W. Meuse, G. Niaura, M. L. Lewis, A. L. Plant, *Langmuir* **1998**, *14*, 1604–1611.
- [20] S. V. Sychev, L. I. Barsukov, V. T. Ivanov, *Eur. Biophys. J.* **1993**, *22*, 279–288.
- [21] X. Jiang, M. Engelhard, K. Ataka, J. Heberle, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10808–10815.
- [22] E. Bamberg, H. J. Apell, H. Alpes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 2402–2406.
- [23] B. Klasczyk, V. Knecht, R. Lipkowsky, R. Dimova, *Langmuir* **2010**, *26*, 18951–18958.
- [24] A. Cordomé, O. Edholm, J. J. Perez, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 1397–1408.