

Spektroskopische Analyse biologischer Prozesse in Grenzschichten

Peter Hildebrandt

Technische Universität Berlin, Institut für Chemie, Sekr. PC14, Straße des 17. Juni 135, D-10623 Berlin

Die meisten Prozesse von Proteinen und Enzymen laufen an biologischen Membranen ab und sind dabei Randbedingungen unterworfen, die sich grundsätzlich von denen der Reaktionen in Lösungen unterscheiden. So ist die Beweglichkeit der in die Membran eingebetteten sowie der an der Oberfläche von Membranen gebundenen Proteine eingeschränkt und die dielektrische Konstante des Reaktionsmediums ist deutlich niedriger als in der wässrigen Phase. Der gra-

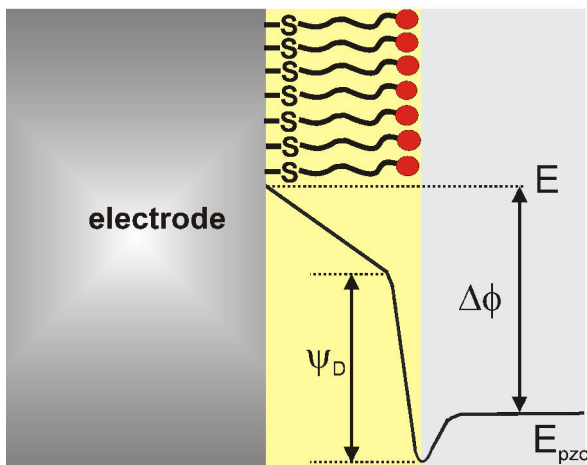
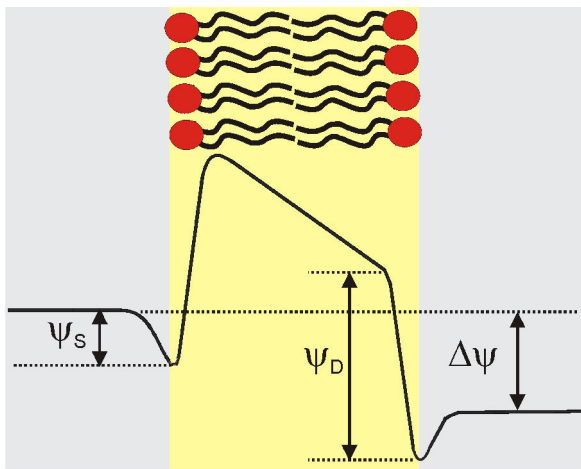


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Potentialverlaufs über eine Biomembran (oben, nach [1]) und einem Membranmodell (unten), bestehend aus einer mit einer SAM beschichteten Elektrode.

vierendste Unterschied bezieht sich jedoch auf die hohen elektrischen Felder im Bereich der polaren oder geladenen Kopfgruppen der Lipiddoppelschicht, das heißt in dem Bereich, in dem zum Beispiel Membran-gebundene Proteine mit löslichen Proteinen in Wechselwirkung treten. Hier können aufgrund der erheblichen Potentialänderungen über eine sehr kurze Distanz die Feldstärken eine Größenordnung von 10^9 V/m erreichen (Abbildung 1) [1].

Solche Feldstärken sind ausreichend, Dipole in Proteinen zu induzieren und auszurichten sowie intramolekulare Protonierungsgleichgewichte zu verschieben und dadurch die Struktur der Biopolymere zu stören. Dies wiederum kann Konsequenzen für die Struktur- und Reaktionsdynamik der Proteine haben.

Insbesondere für Reaktionen, die die Bewegung von Ladungen beinhalten wie zum Beispiel Elektronen- oder Protonentransfer ist eine Beeinflussung durch das elektrische Feld zu erwarten. Tatsächlich liegen bereits

seit vielen Jahren experimentelle Untersuchungen vor, die dokumentieren, dass Ladungstransferreaktionen von Proteinen an und über Membranen durch die lokalen elektrischen Felder kontrolliert werden können [2]. Allerdings sind die zugrunde liegenden Prozesse auf molekularer Ebene keineswegs vollständig verstanden. Dies spiegelt in erster Linie die Schwierigkeit wider, geeignete

experimentelle Ansätze und Methoden zu entwickeln, die hinreichend empfindlich und selektiv sind, um molekulare Prozesse von Biomoleküle an Grenzschichten zu analysieren.

Ein viel versprechender Ansatz, diese Lücke zu schließen, ist in den letzten zehn Jahren entwickelt worden. Er basiert auf der Verwendung von biomimetischen Systemen, die wesentliche Eigenschaften von Biomembranen, insbesondere die lokalen elektrischen Felder, simulieren können [2]. Die einfachsten Membranmodelle bestehen aus einer Metallelektrode (Au, Ag), die mit selbst-organisierten Monoschichten (self-assembled monolayer – SAM) aus ω -funktionalisierten Mercaptanen als Lipidanaloge beschichtet sind und bei geeigneter Wahl der Kopfgruppen lösliche Proteine binden können (Abbildungen 1 und 2). Alternativ können auch Lipiddoppelschichten, in die Membranproteine eingebettet sind, auf die Metalloberfläche aufgetragen werden [2].

Die Metallelektrode erfüllt unterschiedliche Funktionen. Das Elektrodenpotential ist einerseits die

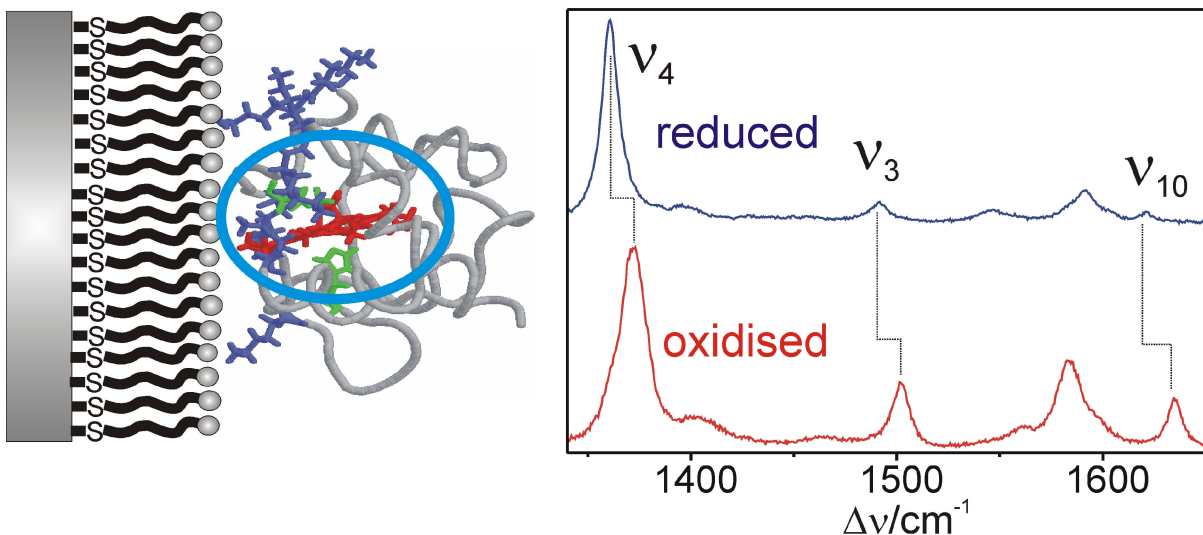


Abbildung 2: Schematische Darstellung des auf einer SAM-beschichteten Elektrode immobilisierten Cyt-c (links) sowie die entsprechenden SERR Spektren der reduzierten (blau) und oxidierten (rot) Form (rechts).

entscheidende Variable zur Steuerung der Elektronentransferreaktionen immobilisierter Redoxproteine, andererseits ist es neben der Dicke der Mono- bzw. Doppelschicht und der Oberflächenladungsdichte ein wichtiger Parameter zur Kontrolle des lokalen elektrischen Feldes. Gleichzeitig ermöglicht die Metallelektrode den Einsatz oberflächensensitiver, spektroskopischer Techniken. Wählt man als Elektrodenmaterial nanostrukturiertes Ag oder Au, kommt es bei Einstrahlung von Licht im sichtbaren und infraroten Spektralbereich durch Kopplung mit den Oberflächenplasmonen des Metalls zu einer Verstärkung des Strahlungsfeldes im Nahfeldbereich. Dieser Effekt resultiert in einer Verstärkung der Infrarotabsorption (*surface enhanced infrared absorption* - SEIRA) um ca. 2 Größenordnungen und der Raman-Streuung (*surface enhanced Raman* – SER) um typischerweise mehr als 4 Größenordnungen, so dass es möglich ist, die immobilisierten Proteine schwingungsspektroskopisch zu charakterisieren [2, 3]. Die Sensitivität

und Selektivität der SEIRA und SER Spektroskopie kann zudem weiter gesteigert werden. Führt man die SEIRA Experimente im Differenzmodus durch, das heißt bezogen auf das Spektren eines Referenzzustandes, zeigen die Differenzspektren lediglich die Signale, die die strukturellen Veränderungen gegenüber dem Referenzzustand widerspiegeln [4]. Wählt man im SER Experiment die Anregungswellenlänge so, dass sie sich in Resonanz sowohl mit den Oberflächenplasmonen des Metalls als auch mit einem elektronischen Übergang des Protein-Kofaktors befindet, werden der SER und der molekulare Resonanz-Raman Effekt kombiniert (*surface enhanced resonance Raman* – SERR) und man beobachtet ausschließlich die Schwingungsbanden des Redoxzentrums der immobilisierten Proteine (Abbildung 2) [2, 3].

SEIRA und SERR Spektroskopie liefern Informationen nicht nur über die molekulare Struktur der immobilisierten Proteine und ihrer Redoxzentren sowie über Strukturänderungen als Funktion des Elektrodenpotentials sondern auch über Orientierungsänderungen der Proteine relativ zur Elektrodenoberfläche. Beide Techniken können in Verbindung mit der Potentialsprungmethode auch zeitaufgelöst betrieben werden, so dass somit zwei komplementäre Techniken zur Verfügung stehen, die es ermöglichen, die molekulare Struktur und Dynamik von Proteinen an Membranmodellen unter dem Einfluss elektrischer Felder zu studieren [2-4].

Umfassende SERR und SEIRA Untersuchungen wurden an dem löslichen Hämprotein Cytochrom c (Cyt-c) durchgeführt, das durch seine positive geladene (Lysin-reiche) Bindungsdomäne elektrostatisch an SAMs mit negativ geladenen Kopfgruppen (z. B. Carboxylat-Funktionen) bindet, wobei die lokale elektrische Feldstärke am Ort der Proteinbindung in erster Linie durch die Kettenlänge der Mercaptane variiert werden kann [2-4]. Im Fokus stand dabei die Analyse des Redoxprozesses des immobilisierten Proteins. Mit Hilfe der SERR und SEIRA Spektroskopie konnten dabei vier verschiedene elementare Schritte unterschieden und zeitlich verfolgt werden: (i) das Elektronentunneln zwischen dem Redoxzentrum des Cyt-c, einer Hämgruppe, und der Elektrode; (ii) die mit der Elektronenübertragung verknüpften Strukturänderungen des Kofaktors und des Proteins; (iii) die Reorientierung (Rotationsdiffusion) des immobilisierten Proteins; (iv) Redox-unabhängige Strukturänderungen des Proteins und des Kofaktors.

Bei langen Kettenlängen mit mehr als 10 Methylengruppen, entsprechend einer relativ niedrigen Feldstärke, ist Elektronentunneln geschwindigkeitsbestimmend, solange die treibende Kraft gering ist. Unter diesen Bedingungen ist die Reorientierung des immobilisierten Proteins hinreichend schnell (Mikrosekunden), so dass der Elektronentransfer (Sekunden bis Millisekunden) immer aus der Orientierung erfolgt, die die optimale elektronische Kopplung zwischen Häm und Elektrode aufweist [5]. Auch die Redox-verknüpften Strukturänderungen des Proteins und des Kofaktors, das heißt die strukturelle Reorganisation des Cyt-c, erfolgt instantan mit dem Elektronentransfer. Mit abnehmender Kettenlänge und damit steigender Feldstärke verlangsamt sich die Reorientierung des Cyt-c, so dass dieser Schritt schließlich geschwindigkeitsbestimmend wird. Dies ist primär das Resultat einer feldabhängigen Erhöhung der Aktivierungsenergie für die Rotationsdiffusion des

immobilisierten Cyt-c. Zudem wirkt das elektrische Feld auch dem Elektronentransfer selbst entgegen, was sich vor allem bei Kettenlängen von weniger als 5 Methylengruppen in einer Abnahme der Tunnelgeschwindigkeit bemerkbar macht.

Es ist durchaus denkbar, dass eine Feld-abhängige Modulation des Redoxprozesses auch unter physiologischen Bedingungen für die Reduktion der in der inneren Mitochondrienmembran gebundenen Cytochrom c Oxidase (CcO) durch Cyt-c von Bedeutung ist. Dies wäre eine Erklärung für frühere Befunde, die eine Inhibierung der Reduktion der in Liposomen rekonstituierten CcO durch Erhöhung des Transmembranpotentials zeigen [2].

Auch ein weiterer Feld-abhängiger Prozess des Cyt-c spielt möglicherweise in der Natur eine große Rolle. Bei sehr kurzen Kettenlängen an Modellmembranen und damit sehr hohen elektrischen Feldern werden im Cyt-c strukturelle Änderungen des Redoxzentrums und der

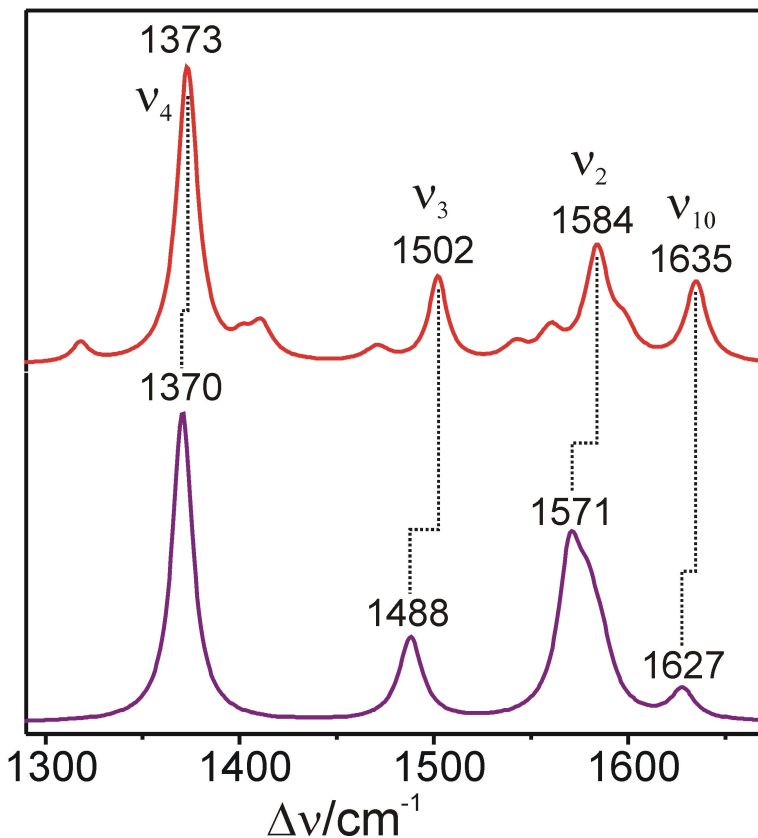


Abb. 3. Komponentenspektren der oxidierten Formen des nativen Cyt-c (oben), in dem das Hämeisen durch einen Methionin- und einen Histidinliganden axial koordiniert ist, und der Cyt-c spezies, die bei hohen elektrischen Feld-stärken unter Verlust des Methioninliganden gebildet wird.

Proteinumgebung induziert, die zu einer drastischen Verringerung des Redoxpotentials und einer Erhöhung der Peroxidase-Aktivität des Cyt-c führen (Abbildung 3). Dadurch würde das Protein einerseits seine Funktion als Elektronentransporter vom Komplex III zur CcO verlieren, könnte aber andererseits die Peroxidation der Cardiolipine, der Hauptlipidkomponente in der inneren Mitochondrienmembran, katalysieren [6]. Dieser Prozess wird als erster Schritt bei der Überführung des Cyt-c in das Cytosol angesehen, wo Cyt-c an der Induktion und Steuerung apoptotischer Prozesse beteiligt ist.

Für eine umfassende, auch quantitative Beschreibung der Feld-abhängigen Prozesse von Proteinen bedarf es einer möglichst genauen

Bestimmung der elektrischen Feldstärke an verschiedenen Positionen der Elektrode/SAM/Protein Grenzschicht. Auch hier stellen die SEIRA und SER Spektroskopie die Methode der Wahl dar, da sie die Schwingungsfrequenzen von sogenannten Feldsonden (z. B. Nitrilgruppen) abfragen können. Aus den Frequenzen dieser Gruppen, die an verschiedenen Positionen in der SAM oder

des immobilisierten Proteins eingeführt werden können, lassen sich direkt die lokalen elektrischen Feldstärken ermitteln.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass mit der SEIRA und SERR Spektroskopie ganz generell zwei Oberflächen-sensitive und –selektive Techniken zur Verfügung stehen, mit deren Hilfe komplexe Grenzprozesse auf molekularer Ebene analysiert werden können. Das Potential dieser Technik geht fraglos über die Biomimetik und die biologische Grundlagenforschung hinaus und eröffnet neue Möglichkeiten insbesondere im Bereich der (Bio-)Analytik und der Grenzflächenwissenschaften.

Literatur:

- [1] Clarke RJ (2001) The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection. *Adv. Colloid Int. Science* **89**, 263-281.
- [2] Murgida DH & Hildebrandt P (2005) Redox and redox-coupled processes of heme proteins and enzymes at electrochemical interfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7**, 3773-3784.
- [3] Murgida DH, Hildebrandt P (2008) Disentangling interfacial redox processes of proteins by SERR spectroscopy. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 937-945.
- [4] Wisitruangsakul N, Zebger I, Ly KH, Murgida DH, Egkasit S, & Hildebrandt P (2008) Redox-linked protein dynamics probed by time-resolved surface enhanced infrared absorption spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 5276-5286.
- [5] Paggi D, Martín DF, Kranich A, Hildebrandt P, Martí M, & Murgida DH (2009) Computer simulation and SERR detection of cytochrome c dynamics at SAM-coated electrodes. *Electrochim. Acta* **54**, 4963-4970.
- [6] Basova LV, Kurnikov IV, Wang L, Ritov VB, Belikova NA, Vlasova II, Pacheco A A, Winnica DE, Peterson J, Bayir H, Waldeck DH, & Kagan VE (2007) Cardiolipin switch in mitochondria: Shutting off the reduction of cytochrome c and turning on the peroxidase activity. *Biochemistry* **2007**, *46*, 3423-3434.