

Institut für Bio- und Nanosysteme
Bioelektronik (IBN-2)

Optimierte Immobilisierung von Redoxproteinen an funktionale Elektrodenoberflächen für die molekulare Bioelektronik

Florian Schröper

Optimierte Immobilisierung von Redoxproteinen an funktionale Elektrodenoberflächen für die molekulare Bioelektronik

Florian Schröper

Berichte des Forschungszentrums Jülich; 4300
ISSN 0944-2952
Institut für Bio- und Nanosysteme
Bioelektronik (IBN-2)

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL) unter
<http://www.fz-juelich.de/zb/juwel>

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek, Verlag
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

*„Suchen, das ist das Ausgehen von alten Beständen und
ein Findenwollen von bereits Bekanntem im Neuen.
Finden, das ist das völlig Neue.
Alle Wege sind offen und
was gefunden wird, ist unbekannt.
Es ist ein Wagnis, ein heiliges Abenteuer.“*

Pablo Picasso

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Theoretische Grundlagen	5
2.1 Kontaktierung von Proteinen mit Nanoelektroden	5
2.2 Cytochrom c als Modellprotein für Redoxvorgänge	12
2.3 Immobilisierungsstrategien für Proteine.....	17
2.3.1 Immobilisierung durch Physisorption	17
2.3.2 Kovalente Immobilisierungsstrategien	19
2.3.3 Immobilisierung mittels Bioaffinität.....	24
2.4 Ladungstransfer durch organische Moleküle.....	28
3. Material und Methoden	31
3.1 Geräte	31
3.2 Chemikalien.....	33
3.3 Puffer und Medien	36
3.4 Expressionssystem	37
3.4.1 Expressionsvektor.....	37
3.4.2 Bakterienstämme	39
3.5 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden.....	40
3.5.1 Kultivierung von Bakterien	40
3.5.2 Rekombinante DNA-Techniken	40
3.5.3 Protein Aufreinigung	48
3.6 Chemische und biochemische Präparationen.....	54
3.6.1 Verwendete Elektroden.....	54
3.6.2 Beschichtung mit selbstorganisierenden Monolagen.....	56
3.6.3 Immobilisierungsmethoden	57

3.7	Physikalische Analysemethoden	60
3.7.1	Optische Methoden	60
3.7.2	Zyklovoltammetrie	63
3.7.3	Rasterelektronenmikroskopie	68
3.7.4	Rasterkraftmikroskopie	68
3.7.5	Elektrische Charakterisierung von Tunnelströmen an Crossbars	69
4.	Herstellung genetisch modifizierter Cytochrom c Konstrukte.....	71
4.1	Auswahl der Immobilisierungs Tags	72
4.1.1	Histidin Tag	72
4.1.2	Cystein Tag	74
4.2	Klonierung der Immobilisierungstags	77
4.2.1	PCR Amplifikation	77
4.2.2	Ligation	80
4.2.3	Transformation und Selektion	80
4.3	Proteinexpression	81
4.4	Proteinaufreinigung.....	82
4.5	Untersuchung auf Funktionalität	86
5.	Ergebnisse und Diskussion.....	93
5.1	Redoxverhalten von Cytochrom c auf makroskopischen Elektroden.....	93
5.1.1	Elektrostatistische Immobilisierung auf selbstorganisierenden Monolagen ..	94
5.1.2	Kovalente Immobilisierung	117
5.1.3	Microperoxidase-11	123
5.2	Redoxverhalten von Cytochrom c auf nanostrukturierten Au Elektroden..	127
5.2.1	Oberflächencharakterisierung von Au Nanopillar Elektroden	129
5.2.2	Redoxverhalten von Cytochrom c auf Au Nanopillar Elektroden	137

5.3 Bifunktionale Immobilisierung von rekombinantem Cytochrom c auf Elektrodenoberflächen.....	143
5.3.1 Oberflächenimmobilisierung	143
5.3.2 Redoxverhalten auf Au Elektroden	154
5.3.3 Elektroenzymatische Reaktion mit Cytochrome c Reduktase / Oxidase	172
5.3.4 Immobilisierung von Cyt c zwischen Crossbarelektroden.....	179
 6. Zusammenfassung und Ausblick.....	 185
 7. Literaturverzeichnis.....	 193
 Anhang	 211
 Abkürzungsverzeichnis	 217
 Danksagung	 221
 Lebenslauf und eigene Veröffentlichungen.....	 223

1. Einleitung und Zielsetzung

Die Bioelektronik ist eine sich sehr schnell entwickelnde Forschungsdisziplin an der Schnittstelle zwischen Biologie, Chemie und Physik [Göpel 1995] und beschäftigt sich in ihrem Kernbereich mit der funktionalen Verknüpfung biologischer und elektronischer Komponenten zur Entwicklung neuartiger technischer Bauelemente [Willner und Katz 2005]. Durch die Kopplung von Biomolekülen, wie Enzymen, Biorezeptoren, Antikörpern und DNA, oder sogar ganzen Zellen an elektronische Elemente, ließ sich bereits eine Vielzahl nützlicher Anwendungen realisieren. Jüngste Forschungen auf dem Gebiet der Bioelektronik befassen sich überwiegend mit der Entwicklung von Biosensoren, die die biologische Interaktion mit einem Zielmolekül oder einen stattfindenden biokatalytischen Prozess in ein messbares elektronisches Signal umwandeln [Armstrong und Wilson 2000]. Bioelektronische Forschungsschwerpunkte finden sich ferner auf den Gebieten der molekularen Diagnostik und der Entwicklung von biotechnologischen Brennstoffzellen, bei denen es darum geht, die biokatalytischen Elektronentransfereigenschaften von Enzymen zur Umwandlung organischer Brennstoffsubstrate in elektrische Energie zu nutzen [Katz *et al.* 2003]. Ein weiterer Zweig der bioelektronischen Forschung befasst sich mit der Kopplung von Zellen bzw. neuronalen Netzwerken an elektronische Strukturen, zur Entwicklung von bioelektronischen Hybridsystemen.

Aufgrund der voranschreitenden Miniaturisierung elektronischer Komponenten und bedingt durch das Erreichen von Größenordnungen im Nanometerbereich, bieten sich durch die Kombination von Bio- und Nanoelektronik vollkommen neue Möglichkeiten zur Herstellung maßgeschneiderter molekularer, bioelektronischer Strukturen. Die Entwicklung und Untersuchung solcher biomolekularer Hybridstrukturen ist Gegenstand der molekularen Bioelektronik, wo die Verknüpfung einzelner biologischer Moleküle mit kleinsten elektronischen Strukturen im Vordergrund steht.

Die Verwendung von Biomolekülen, insbesondere von Proteinen, bietet in diesem Zusammenhang eine Fülle von Anwendungsmöglichkeiten. Als Beispiele seien die biokatalytischen oder Struktur ändernden Eigenschaften vieler Proteine, sowie bei Redoxproteinen die Fähigkeit zum Elektronentransfer genannt. Die Natur liefert in Form einer riesigen Palette unterschiedlichster Proteine und Enzyme ein nahezu unerschöpfliches Reservoir von Bausteinen. Darüber hinaus lassen sich Proteine auf vielfältige Weise an Oberflächen immobilisieren, was für bioelektronische Anwendungen im Allgemeinen eine

überaus wichtige Voraussetzung ist. Nicht zuletzt ermöglichen Proteine aufgrund ihrer geringen Größe eine hohe Integrationsdichte für bioelektronische Hybridstrukturen.

Für die molekulare Bioelektronik ist die Fähigkeit von Redoxproteinen zum Elektronentransfer von besonderem Interesse. Zentrale Fragestellungen in diesem Zusammenhang sind, wie sich einzelne oder kleine Gruppen dieser Redoxproteine elektronisch kontaktieren lassen, und wie der Elektronentransfer durch diese Moleküle kontrolliert werden kann. Um diese Fragen klären zu können, müssen zunächst Erkenntnisse über den Elektronentransfer an der Kontaktstelle zwischen Protein und makroskopischen, zweidimensionalen (2D) Elektroden gewonnen und diese anschließend auf kleinere Elektrodengrößen übertragen werden. So kann eine schrittweise Miniaturisierung der Strukturen über 2D Mikroelektroden, eindimensionale Nanoelektroden, bis hin zu einzelnen Nanokontakten erfolgen.

Ein für diese Untersuchungen besonders geeignetes Redoxprotein ist Cytochrom *c* (Cyt *c*). In den Mitochondrien dient es als Elektronenshuttle zwischen den Transmembranprotein-komplexen der Atmungskette und überträgt Elektronen vom Cytochrom *bc1* Komplex auf die Cytochrom *c* Oxidase. Aufgrund seiner Fähigkeit, einzelne Elektronen zu speichern und unter definierten Bedingungen abzugeben, ist Cyt *c* ein ideales Modellprotein zur Erforschung der inter- und intramolekularen Elektronentransferprozesse.

Für die Untersuchung der Elektronentransfercharakteristik müssen, um einzelne Elektronentransferereignisse messen zu können, Redoxproteine zwischen zwei nanoskopischen Elektroden platziert werden. Es findet sich eine Vielzahl von Nanoelektroden bzw. Techniken, mit denen sich Nanokontakte zu einzelnen Molekülen realisieren lassen. Beispiele hierfür sind mechanisch kontrollierte Bruchkontakte [Reed *et al.* 1997], „*crossed-wire tunneling junctions*“ [Kushmerick *et al.* 2003] bzw. gekreuzte Elektroden (Crossbars) [Heath *et al.* 1998], „*Nanogaps*“ [Krahne *et al.* 2002], die Rastertunnel-mikroskopie [Xu und Tao 2003], sowie die Rasterkraftmikroskopie [Cui *et al.* 2001].

Am Institut für Bio- und Nanosysteme (IBN-2) des Forschungszentrums Jülich werden mikro- und nanoskopische Crossbarelektroden, sowie Nanoelektroden, die auf mechanisch kontrollierten Bruchkontakten basieren (Abbildung 1.1), entwickelt. Diese sollen für die Kontaktierung einzelner Moleküle genutzt werden. Abbildung 1.2 zeigt schematisch die Kontaktierung weniger Redoxproteine zwischen zwei Crossbarelektroden (Abb. 1.2 a) bzw. den Einzelkontakt eines Proteins mit zwei Nanoelektroden in einem Bruchkontakt (Abb. 1.2 b).

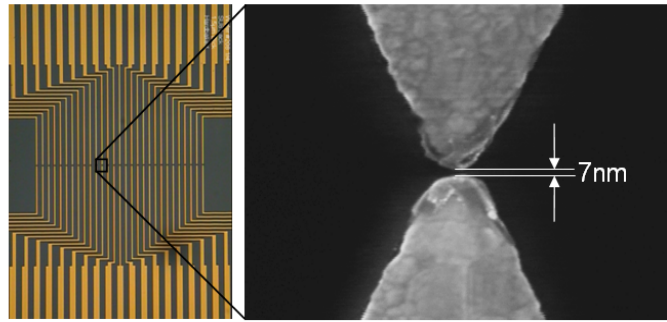


Abb. 1.1 Aufsicht auf einen Nanokontaktchip mit mehreren parallelen Au Leiterbahnen (links) und rasterelektronenmikroskopische Abbildung eines einzelnen mittels Elektronenstrahl-Lithographie hergestellten unterbrochenen Nanokontaktes (rechts).

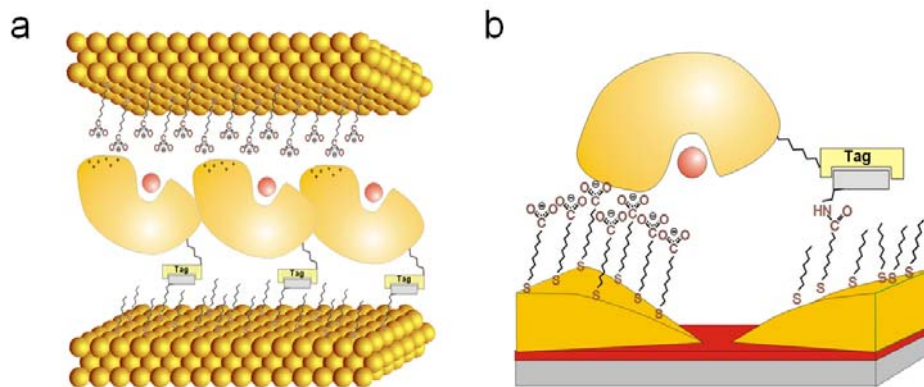


Abb. 1.2 Schematische Darstellung von Proteinen zwischen nanoskopischen Goldelektroden: (a) wenige Redoxproteine sind zwischen zwei sich kreuzenden Elektroden (Crossbarelektroden) immobilisiert; (b) ein einzelnes Protein ist gerichtet zwischen zwei Nanoelektroden in einem Bruchkontakt immobilisiert.

Abbildung 1.2 soll verdeutlichen, dass für die Realisierung von nanoskopischen Elektrode/Protein/Elektrode Kontakten das Redoxprotein an beide Elektroden in polarisierter Orientierung gebunden sein muss, um einen reproduzierbaren Elektronentransfer zu erhalten. Dieses kann durch eine bifunktionale Immobilisierung des Proteins unter Verwendung zweier unterschiedlicher Immobilisierungsstrategien erreicht werden. Dabei kann im Wesentlichen zwischen der Immobilisierung über physikalische Wechselwirkungen (Physisorption), der kovalenten Immobilisierung und der Bindung mit Hilfe spezieller Affinitätstags unterschieden werden (siehe Kapitel 2.3).

Für die Immobilisierung von Cyt c auf bzw. zwischen nanoskopischen Elektroden sollten im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Immobilisierungsstrategien geprüft und ihr Einfluss

auf den Elektronentransfer untersucht werden. Dabei war es Aufgabe, das Redoxverhalten von Cyt c primär auf makroskopischen 2D, aber auch auf nanostrukturierten Elektrodenoberflächen elektrochemisch zu charakterisieren. Neben konventionellen Immobilisierungsstrategien für Cyt c, wie beispielsweise der elektrostatischen Anbindung, sollten alternative Konzepte zur gerichteten Immobilisierung entwickelt und untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollten genetisch modifizierte Cyt c Konstrukte mit unterschiedlichen Affinitätstags (His und Cys Tags) an definierter Position hergestellt werden, da die Orientierung des Proteins bei der Immobilisierung über Affinitätstags maßgeblich beeinflusst werden kann. Ziel war es die rekombinanten Proteine bifunktional in optimierter polarer Orientierung auf und zwischen Elektrodenoberflächen zu immobilisieren, sodass ein schneller und reversibler Elektronentransfer zwischen Elektrode und Cyt c bzw. durch das immobilisierte Protein, bei gleichzeitigem Erhalt der natürlichen Funktionalität, erfolgen kann. Es sollte ein Cyt c Konstrukt identifiziert werden, das sich für die bifunktionale Immobilisierung einzelner Moleküle zwischen nanoskopischen Elektroden eignet und als Grundlage für weiterführende Untersuchungen auf nanoskopischen Elektroden dienen kann.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Kontaktierung von Proteinen mit Nanoelektroden

Die stetig voranschreitende Miniaturisierung elektronischer Komponenten und das Erreichen elektronischer Strukturgrößen von wenigen Nanometern ermöglichen neue technische Ansätze zur Herstellung noch kleinerer, molekularelektronischer Strukturen. Schwerpunkt der molekularen Elektronik ist, in Erweiterung zur herkömmlichen Silizium-basierten Nanoelektronik, neue Konzepte zur Herstellung komplexer, funktionaler elektronischer Bauelemente zu entwickeln. Eines der Hauptziele ist die Realisierung von elektronischen Bauelementen, die Einzelmoleküle elektrisch adressieren. Eine der größten Herausforderungen hierbei ist die wirksame Verknüpfung einzelner Moleküle mit nanoelektronischen Strukturen. Seit Mitte der 1990er Jahre wurden große Fortschritte in der Entwicklung von molekularelektronischen Bauelementen erzielt [Joachim *et al.* 2000]. So konnte bereits gezeigt werden, dass einzelne organische Moleküle als nanoskopische Gleichrichter [Metzger *et al.* 1997] und Nanoschalter [Reed *et al.* 2001; Roth und Joachim 1997] genutzt werden können.

Biomoleküle und insbesondere Proteine sind vielversprechende Kandidaten für die Realisierung nanoskopischer bzw. nanoelektronischer Bauelemente. Sie wurden evolutionär für bestimmte Funktionen wie Ladungsspeicherung oder -transport optimiert und besitzen die Fähigkeit sich zu komplexen Funktionseinheiten zu organisieren. Diese Eigenschaften kann sich die molekulare Bioelektronik zu Nutzen machen. Hier befasst man sich mit der Verknüpfung einer geringen Anzahl bzw. einzelner Biomoleküle mit nanoelektronischen Strukturen, mit dem Ziel elektronische Signale zu transferieren und zu verarbeiten. Die molekulare Bioelektronik bietet prinzipiell zwei unterschiedliche Ansätze. So können Biomoleküle mit ihren Erkennungs- und Selbstorganisationseigenschaften als Template für die Abscheidung von anorganischen Materialien genutzt werden, die anschließend in elektronische Strukturen integriert werden. Ziel dabei ist die Verknüpfung von biomolekular basierten *bottom up* Strategien mit *top down* Bauelementfabrikationen. Alternativ sollen einzelne Biomoleküle als aktive Komponenten mit elektronischen Strukturen gekoppelt werden, um die biologischen Funktionen dieser Moleküle ausnutzen zu können. Dieser Teil

der Bioelektronik ist Gegenstand der vorgelegten Arbeit. Er ist eng verknüpft mit dem Teil der Biosensorik, bei dem eine elektrische Signalwandlung erfolgt.

Die Realisierung bioelektronischer Hybridstrukturen mit einzelnen Biomolekülen als Funktionseinheiten erfordert eine Vielzahl an Entwicklungsschritten, auf die in den folgenden Abschnitten kurz eingegangen werden soll. Dabei stehen 1.) die Auswahl und Charakterisierung geeigneter biomolekularer Systeme; 2.) die Entwicklung zweckmäßiger Immobilisierungsstrategien für die Moleküle auf der Elektrodenoberfläche; 3.) die Herstellung der Nanostrukturen; 4.) die Kontaktierung der Moleküle; 5.) das Auslesen der Signale; 6.) sowie die Verarbeitung und Interpretation der Informationen [Rinaldi und Cingolani 2004] im Vordergrund. Darüber hinaus müssen, um die Ladungstransferreaktionen an Einzelmolekülen studieren zu können, Erkenntnisse zum Ladungstransfer von Proteinen auf planaren 2D Makroelektroden, wie Au(111) Oberflächen, auf kleinere Funktionseinheiten übertragen werden. Durch schrittweise Miniaturisierung der Elektroden über 2D Mikroelektroden zu 1D Nanoelektroden und Untersuchung der elektrochemischen Prozesse an der Grenzschicht zwischen Elektrode und immobilisiertem Protein, lassen sich fundamentale Erkenntnisse des Ladungstrfers an kleinen und nanostrukturierten Elektroden gewinnen. Der letzte Schritt dieses Miniaturisierungsprozesses ist schließlich die Immobilisierung eines einzelnen Proteins auf einer 0D Nanoelektrode, was zu einem einzelnen Nanokontakt führt.

Bioelektronische Systeme basieren auf dem direkten Elektronentransfer zwischen elektronischen Strukturen und Biomolekülen und erfordern einen schnellen und reversiblen Elektronentransfer entlang effizienter Elektronentransferpfade. Die Auswahl und Charakterisierung von geeigneten biomolekularen Systemen erfolgt für gewöhnlich auf makroskopischen 2D Elektroden. Für die Untersuchung des Elektronentrfers bietet sich eine Vielzahl von Redoxproteinen an. Darunter sind Metalloproteine, wie Ferritin [Wu und Hu 2004], Cytochrom c [Fedurco 2000], Myoglobin [Lvov *et al.* 1998], Azurin [Chi *et al.* 2001], Hämoglobin [Scheller 1977], Katalase [Chen X. *et al.* 2001], Glucoseoxidase [Jiang *et al.* 1995, Guiseppi-Elie *et al.* 2002] und Peroxidasen [Ruzgas *et al.* 1996], die bereits alle in vielseitigen bioelektronischen Untersuchungen und Anwendungen zum Einsatz kamen. Eine Übersicht über die bioelektronische Bedeutung findet sich bei [Willner und Katz 2005; Wu und Hu 2007].

Die Entwicklung geeigneter Immobilisierungsstrategien für die molekulare Bioelektronik ist zentrales Thema dieser Arbeit und wird ausführlich diskutiert. Die Untersuchungen zum

Ladungstransfer in Abhängigkeit der Immobilisierung erfolgen standardmäßig an 2D Makroelektroden. Eine Übersicht über die unterschiedlichen, zur Verfügung stehenden Immobilisierungsstrategien findet sich in Kapitel 1.3.

Für die Untersuchung des Elektronentransfers an bio-anorganischen Bauelementen ist neben der Auswahl geeigneter Redoxproteine, die Herstellung der Nanoelektroden von besonderer Bedeutung. Prinzipiell lassen sich alle Techniken, die für die molekulare Elektronik entwickelt wurden auch auf die molekulare Bioelektronik anwenden. Beispiele hierfür sind Crossbarstrukturen, *crossed-wires*, rastertunnelmikroskopische und rasterkraftmikroskopische Ansätze, Quecksilbertropfen-Elektroden, *Nanogaps* bzw. Nanoporen, sowie Bruchkontakte. Dabei kann man grundsätzlich zwei Architekturen unterscheiden. Werden Biomoleküle zwischen zwei entgegengesetzt geladene Nanoelektroden immobilisiert, so spricht man von zwei-terminalen Bauelementen, die beispielsweise einem diodenähnlichen Aufbau entsprechen. Durch Einbeziehen einer dritten Elektrode (Steuerelektrode), lässt sich der Ladungstransfer wie bei einem Feldeffekttransistor modulieren. In diesem Fall spricht man von drei-terminalen Bauelementen. Dieses 2- bzw. 3-Elektroden-Prinzip gilt über viele Längenskalen, wodurch Untersuchungen an 2D Mikro-, 1D Nano-, bis hin zu 0D Einzelmolekülelektroden möglich sind.

Die funktionale, polarisierte Kontaktierung von Redoxproteinen an zwei- bzw. drei-terminale Bauelemente wird in dieser Arbeit schwerpunktmäßig thematisiert. In der Literatur werden unterschiedliche Ansätze zur Kopplung von Redoxproteinen für die Untersuchung des Ladungstransfers beschrieben. Nachfolgend werden einige Beispiele zur Illustration erläutert.

Ein für die molekulare Elektronik sehr interessantes Redoxprotein ist Cyt c. Der Mechanismus des Elektronentransfers durch dieses Protein ist bisher wenig verstanden. Um diesen aufklären zu können und generelle Erkenntnisse zum Tunnelprozess durch Redoxproteine zu gewinnen, sind Einzelmolekülkontaktierungen von großem Interesse. [Delfino *et al.* 2007] untersuchten intensiv Hefe Cyt c (YCC) auf unterschiedlichen Elektrodenoberflächen und realisierten Einzelmolekülkontakte. Die Untersuchungen erfolgten mittels Kontakt-Rasterkraftmikroskopie (C-AFM). In einem 2-Elektrodenansatz wurde die Strom-Spannungs-Charakteristik einzelner YCC Moleküle im Kontakt mit einer Au oder einer nicht-metallischen Elektrode gemessen. Einzelne YCC Moleküle wurden auf der Elektrodenoberfläche oder alternativ der Au beschichteten AFM Spitze kovalent über Cys102 immobilisiert. Anschließend erfolgte die Kontaktierung durch Annähern der AFM Spitze an

die Elektrodenoberfläche. Die molekulare Leitfähigkeit konnte gesteigert werden, wenn YCC auf planaren Au(111) Substraten immobilisiert und mit der Au Spitze kontaktiert wurde. Die Steigerung der Leitfähigkeit erfolgte hier bereits bei niedrigen Kräften (2 nN). Wurde das Protein zunächst an die Au Spitze des AFM immobilisiert und dann zusammen mit dieser an eine nicht-metallische Elektrode angenähert, so waren deutlich höhere Kräfte erforderlich, um den Tunnelstrom geringfügig zu steigern. Die Untersuchungen zeigen, dass der Elektronentransfer durch Einzelmoleküle maßgeblich von der Beschaffenheit und dem Material der Nanoelektroden, auf denen das Protein immobilisiert ist und von der Art des Kontaktes zwischen Protein und Elektrode abhängt. Diese Erkenntnisse sind, im Hinblick auf die Wahl eines geeigneten Elektrodenmaterials und der optimierten Kontaktierung des Redoxproteins, für weitere Einzelkontaktstudien von großer Bedeutung.

Einen alternativen Ansatz, der das Funktionsprinzip eines zwei-terminalen nanoskopischen Bauelementes auf der Basis selbstorganisierender Metalloproteine demonstriert, beschreiben Rinaldi und Mitarbeiter [Maruccio *et al.* 2007]. Für ihre Untersuchungen benutzten sie einzelne Moleküle von Azurin (Az) aus *Pseudomonas aeruginosa* [Adman und Harrison 1985], die auf Einzelmolekülebene in einer 2-Elektrodenanordnung zwischen wenige Nanometer große *Mesa-Gap* Strukturen immobilisiert wurden. Durch metall-organisch chemisches Aufdampfen in Kombination mit optischer Lithographie und Nassätzen ließen sich *Gap* Strukturen im Bereich von 5 nm realisieren. In diese *Nanogaps* wurden Az Moleküle gerichtet, über die Oberflächen-Cysteine gebunden, wobei aufgrund des Durchmessers von Az (4-5 nm) nur ein kleiner Teil der Proteine so zwischen den Metallelektroden immobilisiert war, dass sie einen parallelen Beitrag zum Elektronentransfer leisten konnten. Zwischen den Elektroden wurde nach Immobilisierung der Az Moleküle ein erhöhter Tunnelstrom gemessen, und unter bestimmten Potentialbedingungen konnte ein negativer differentieller Widerstand (*negative differential resistance, NDR*) beobachtet werden. Die Strom-Spannungs-Charakteristik weist auf einzelne oder wenige parallele Elektronentransferreaktionen über Az Moleküle hin. Die charakteristischen Beobachtungen, insbesondere der *NDR*, geben Aufschluss über die Elektronentransferpfade und den für den Elektronentransfer durch Az verantwortlichen Tunnelmechanismus.

Eine andere Forschungsarbeit von [Rinaldi und Cingolani 2004] befasst sich mit der Realisierung sowohl zwei-terminaler, als auch drei-terminaler nanoskopischer Bauelemente mit Az. Für ihre Untersuchungen wurden einzelne Az Moleküle zwischen zwei Nanoelektroden immobilisiert. Die Geometrie der Nanostrukturen wurde so gewählt, dass zwei planare Au/Cr Elektroden durch einen *Nanogap* in der Größenordnung zwischen 10 nm

und 100 nm voneinander getrennt waren. In diesen Spalt wurden Az Moleküle in 2-Elektrodenanordnung mit unterschiedlichen Strategien immobilisiert. Es gelang [Rinaldi und Cingolani 2004] einen Tunnelstrom zwischen den Elektroden zu messen. Die Strom-Spannungskurven des Vor- und Rückscans zeigten ein asymmetrisches Bild, was auf ein deutliches diodenähnliches Verhalten hindeutet. Die Höhe des Tunnelstroms zeigte eine Abhängigkeit von der Immobilisierungsstrategie. Der Tunnelstrom bei orientiert immobilisiertem Az war etwa 10-fach höher als bei zufälliger Anordnung.

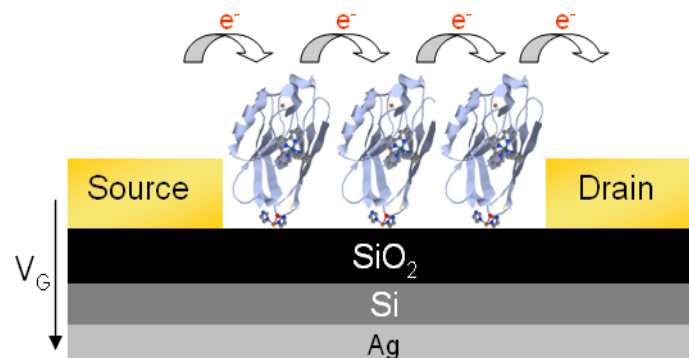


Abb. 2.1 Schematische Querschnittszeichnung und schrittweiser Elektronentransport des Protein Feldeffekttransistors nach [Rinaldi und Cingolani 2004]. Azurin wurde über Oberflächen-Cysteine an SiO₂ gebunden. Der Feldeffekttransistor bestand aus einer Protein Monolage, über die zwei pfeilförmige Cr/Au Elektroden auf SiO₂ verbunden waren. Eine Ag Elektrode auf der Unterseite des Si Substrates diente als *Backgate* Elektrode.

Durch Aufbringung einer dritten Elektrode an der Rückseite des Si Substrates als *Backgate* zum Kontrollieren der Leitfähigkeit zwischen *Source* und *Drain* gelang es [Rinaldi und Cingolani 2004], ein transistorähnliches Verhalten zu zeigen. Analog zu Feldeffekttransistoren, wie sie aus der Mikroelektronik bekannt sind, ließ sich die Höhe des Tunnelstroms über die angelegte Gate-Spannung modulieren. Es kam dabei zu einem mehrschrittigen Elektronentransfer zwischen benachbarten Az Molekülen (Abbildung 2.1). Die Versuche von [Rinaldi und Cingolani 2004] demonstrieren die prinzipielle Eignung derartiger Hybridstrukturen als biomolekulare Dioden oder Schalter.

Ulstrup und Mitarbeiter [Chi *et al.* 2005] benutzten Az für umfassende Untersuchungen von *long-range* Elektronentransferprozessen und zum *in situ* aufzeichnen der redoxkontrollierten Tunnelresonanz an Einzelmolekülen. Sie immobilisierten Az über den hydrophoben Bereich des Proteins auf Thioalkanen und benutzten elektrochemische Rastertunnelmikroskopie

(ECSTM) zur Messung der Einzelmolekül Strom-Spannungs-Zusammenhänge (Abbildung 2.2). Die Untersuchungen erfolgten im Elektrolyten, wobei sich ein elektrochemisches Potential über eine Referenzelektrode anlegen ließ. Man spricht daher bei dieser 3-Elektrodenanordnung auch von einem elektrochemischen Gate.

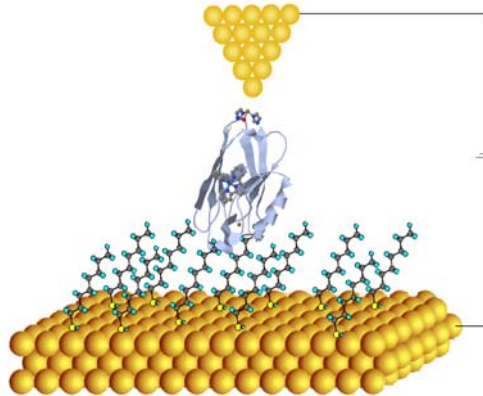


Abb. 2.2 Schematische Zeichnung der Kontaktierung von Az mittels ECSTM. Az wurde auf einer mit Thioalkanen beschichteten Au(111) Oberfläche immobilisiert und mit einer Au ECSTM Spitze kontaktiert.

[Chi *et al.* 2005] beschrieben einen zweistufigen Tunnelprozess. Bei negativen Vorspannungen kam es zunächst zum Elektronentransfer zwischen ECSTM Spitze und Cu Atom des Az und im zweiten Schritt zum Tunnelprozess zwischen Az und Substrat. Bei positiven Vorspannungen erfolgte der Tunnelprozess in umgekehrter Richtung. Die Höhe der Tunnelströme ließ sich über das elektrochemische Gate kontrollieren. Obwohl Az ein großes und komplex aufgebautes Molekül ist, war ECSTM ausreichend empfindlich, um die direkte redoxkontrollierte Elektronen-Tunnelresonanz dieses Proteins zu beobachten. Die Ergebnisse können maßgeblich zum Verständnis des *long-range* Elektronentransfers durch Proteine beitragen und sind daher von fundamentalem Interesse für die molekulare Bioelektronik.

Eine ebenfalls interessante Forschungsarbeit, die die Bedeutung der molekularen Bioelektronik als Teil der Biosensorik verdeutlicht und von Relevanz für die Entwicklung neuartiger nanoskopischer Biosensoren, sowie die Erforschung einzelmolekularer enzymatischer Prozesse ist, beschreiben [Bestemann *et al.* 2003]. Sie immobilisierten das Redoxenzym Glucoseoxidase (GOx) auf den Seitenwänden eines einzelnen, halbleitenden *Singlewall Carbon Nanotubes* (SWCNT), das als molekularer Transistor zwischen zwei metallischen Nanokontakten platziert war (Abbildung 2.3). Die Immobilisierung der GOx

Moleküle erfolgte mit Hilfe eines Linkermoleküls [Chen R.J. *et al.* 2001]. Das halbleitende SWCNT hatte die Funktion eines molekularen Feldeffekttransistors, wobei die Gate-Spannung als Potential zwischen einer Gegenelektrode, einer Referenzelektrode, sowie dem SWCNT in wässriger Lösung aufgebaut wurde. Bei diesem Versuchsansatz handelte es sich somit um eine 3-Elektrodenanordnung mit elektrochemischer Gate-Elektrode.

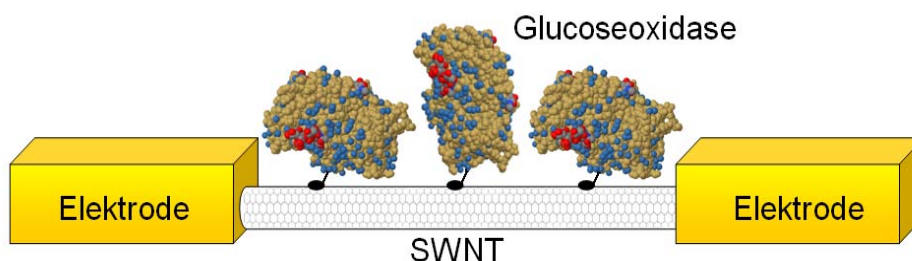


Abb. 2.3 Schematische Zeichnung nach [Bestemann *et al.* 2003] zweier Nanoelektroden, die über einen SWCNT verbunden sind. GOx Moleküle sind über ein Linkermolekül an die Oberfläche des SWCNT immobilisiert.

Nach der Immobilisierung der GOx konnte eine deutliche Reduzierung der Leitfähigkeit des SWCNT beobachtet werden. Die Ursache hierfür vermuteten [Bestemann *et al.* 2003] in einer veränderten Kapazität, als Folge der immobilisierten GOx. Für biosensorische Anwendungen ist dieses System interessant, da die Leitfähigkeit der mit GOx beschichteten SWCNT eine deutliche Abhängigkeit von pH-Wert und Glucosekonzentration zeigte. Mit zunehmendem pH-Wert und durch Zugabe von Glucose, dem natürlichen Substrat der GOx, konnte die Leitfähigkeit des SWCNT gesteigert werden. Das entwickelte System ist somit in der Lage, als nanoskopischer Biosensor, Änderungen des pH-Wertes und der Glucosekonzentration zu detektieren. [Bestemann *et al.* 2003] stellen in Aussicht, dass mit einem entsprechend kurzen SWCNT (~20 nm) die Enzymaktivität eines einzelnen GOx Moleküls gemessen werden könnte. Dieses System ist somit neben seinem Potential als Nano-Biosensor, auch für Einzelmolekulare enzymatische Untersuchungen relevant. Die potentielle Bedeutung dieser Technik für die molekulare Diagnostik zeigt sich anhand jüngster Publikationen. Durch Immobilisierung spezifischer Rezeptormoleküle bzw. Antikörper an die Oberfläche von SWCNT [Zhang *et al.* 2007] oder Si basierten *Nanowire* Konstrukten [Patolsky *et al.* 2004], ließen sich einzelne Bindungsreaktionen mit spezifischen, viralen Proteinen detektieren. Bei der Bindung kommt es ähnlich wie bei GOx zu einer Verringerung der Leitfähigkeit durch den SWCNT bzw. *Nanowire* Feldeffekttransistor.

Bei Untersuchungen des Ladungstransfers an Einzelmolekülkontakten können, für das Auslesen des Tunnelsignals, zwei unterschiedliche Methoden genutzt werden. Messungen des Tunnelstromes in Abhängigkeit der angelegten Spannung (I/V Verhalten) geben direkten Aufschluss über die Tunnelcharakteristik. Solche Untersuchungen können beispielsweise an Crossbarelektroden durchgeführt werden. Bei der zweiten Methode werden im Bruchkontaktexperiment die Bindungsstellen zwischen Molekül und Elektrodenoberfläche gespalten, wodurch sich in der I/s Kurve charakteristische Stufen ergeben. Diese Stufen repräsentieren den Beitrag der im Bruchkontakt sitzenden Einzelmoleküle zum Tunnelstrom.

Für die Verarbeitung bzw. Interpretation der gemessenen Stromcharakteristiken ist ein Verständnis der in Betracht kommen Ladungstransfermechanismen erforderlich. Die wichtigsten, für den Ladungstransport durch organische Moleküle verantwortlichen Tunnelmechanismen, werden in Kapitel 2.4 beschrieben.

2.2 Cytochrom *c* als Modellprotein für Redoxvorgänge

Wie einleitend erwähnt, eignen sich Redoxproteine aufgrund ihrer guten Elektronentransfereigenschaften in besonderem Maße für bioelektronische Anwendungen. Eines der am besten untersuchten Redoxproteine ist Cytochrom *c* (Cyt *c*). Die Gruppe der Cytochrome umfasst ein Spektrum von über 50 verschiedenen Typen, deren primäre biologische Funktion die Übertragung von Elektronen ist. Die prominentesten Cytochrome sind Cytochrom *a*, *b* und *c*. Alle Cytochrome tragen eine prosthetische Gruppe, mit zentralem Eisenatom, die als Häm-Gruppe bezeichnet wird und an die Aminosäurekette des Proteins gebunden ist. Die Art der Koordinierung des Eisenprotoporphyrins an das umgebende Apoprotein und die jeweilige Aminosäurezusammensetzung variieren bei den Cytochromen. Durch die unterschiedliche Koordinierung der Häm-Gruppe zeigen sich charakteristische Licht-Absorptionsspektren, über die Cytochrome photospektrometrisch identifiziert werden können. Cytochrome kommen hauptsächlich in Mitochondrien und Chloroplasten eukaryotischer Organismen vor. Cyt *c* spielt eine Schlüsselrolle in der Atmungskette innerhalb der Mitochondrienmembran und ist zudem an der Regulierung des oxidativen Stresses und Apoptose auslösenden Mechanismen beteiligt. Cyt *c* findet sich in allen eukaryotischen Organismen. Aber auch bei Prokaryoten finden sich Proteine, die zu Typ-*c* Cytochromen gezählt werden können und Elektronentransportfunktionen ausüben. Cyt *c* lässt sich aufgrund seiner guten Wasserlöslichkeit und den speziellen Ladungseigenschaften gut aufreinigen. Aus diesem Grund gehörte die oxidierte Form von Pferde Cyt *c* zu einem der

ersten Proteine, dessen Kristallstruktur mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht wurde [Dickerson *et al.* 1967]. Detaillierte Untersuchungen zur Sekundärstruktur von Cyt *c*, das aus dem Herzmuskelgewebe von Pferden gewonnen wurde, erfolgten durch [Bushnell *et al.* 1990]. Pferde Cyt *c* ist ein Protein, bestehend aus einer einzelnen Polypeptidkette mit 104 Aminosäuren. Ein Eisenprotoporphyrin IX ist als prosthetische Gruppe über zwei Thioether Bindungen an die Polypeptidkette kovalent gebunden. Das Molekulargewicht beträgt ca. 12,4 kDa [Margoliash und Schejter 1966]. Die Struktur von Cyt *c* mit charakteristischen Sekundärstrukturelementen ist in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt. Die Sekundärstruktur wird im Wesentlichen von drei größeren und zwei kleineren α -helikalen Strukturen bestimmt [Bushnell *et al.* 1990]. Darüber hinaus finden sich zwei sehr kurze Abschnitte (Aminosäuren 37-40 und 57-59), die jeweils ein zweisträngiges anti-paralleles β -Faltblatt formen sowie 6 β -Schleifen. Das gefaltete Protein besitzt eine beinahe globuläre Form mit einem Durchmesser von ca. 3,4 nm. An einer Seite findet sich eine Einstülpung. In dieser Bindungstasche sitzt die Häm-Gruppe. Diese ist beinahe vollständig vom Protein umgeben. Lediglich vier Atome weisen nach außen und haben Kontakt zum umgebenden Medium. Das Eisenprotoporphyrin koordiniert an unterschiedliche Aminosäuren. Über zwei Thioether Bindungen ist es kovalent mit den Aminosäuren Cys14 und Cys17 verbunden. Darüber hinaus koordinieren das Schwefelatom von Met80 und das Stickstoffatom von His18 an das Eisenzentrum und führen so zu einer definierten Lage des Häms innerhalb der Proteinmatrix. Abbildung 2.5 a zeigt die dreidimensionale Struktur von Cyt *c* mit der Häm-Gruppe im Zentrum.

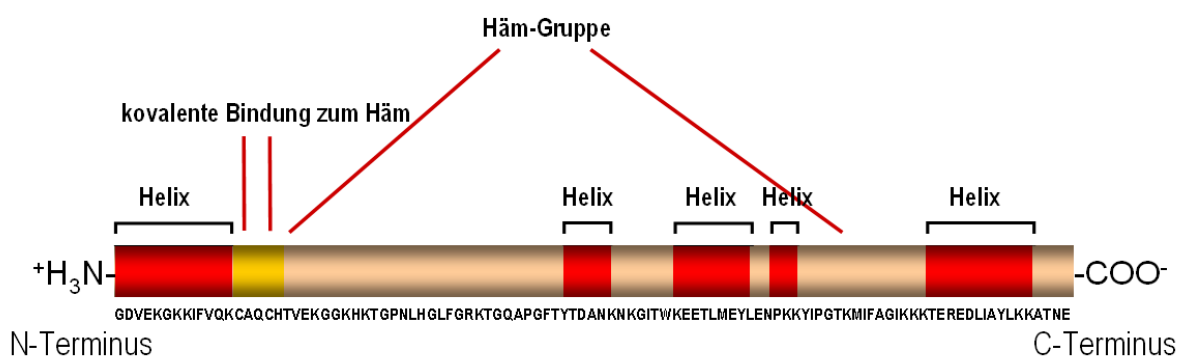


Abb. 2.4 Schematische Darstellung von Pferde Cyt *c*. Helikale Sequenzabschnitte (rot) und Bereiche, die an die Häm-Gruppe binden, sind eingezeichnet. Die Aminosäuresequenz ist im Einbuchstabencode angegeben.

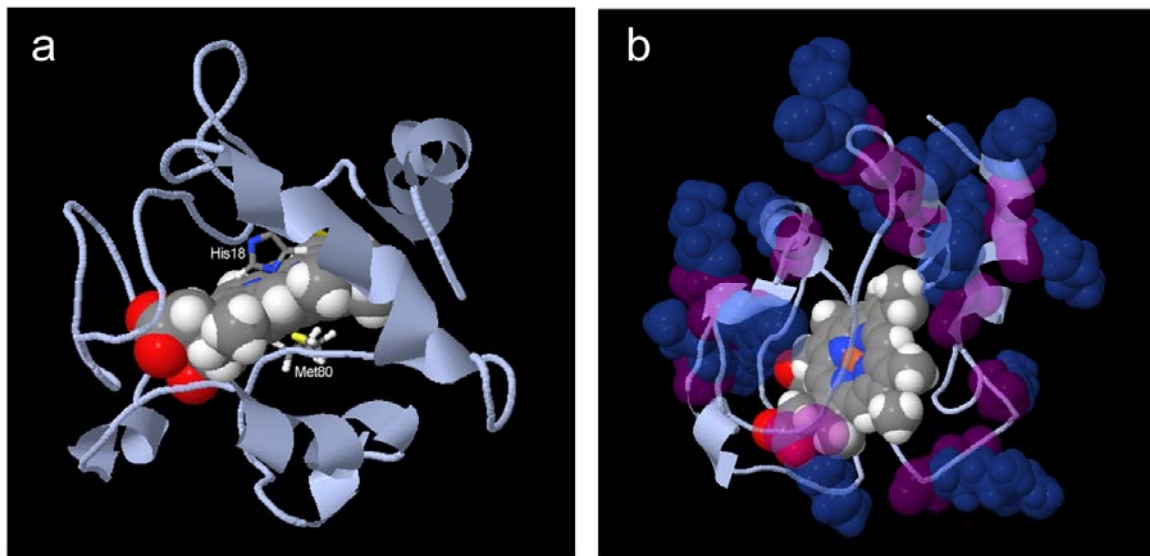


Abb. 2.5 Dreidimensionale Struktur von oxidiertem Pferdeherz Cyt *c* nach [Banci *et al.* 1999] mit hervorgehobener Häm-Gruppe erstellt mit FirstGlance in Jmol (Vers. 1.02): (a) Die an der koordinativen Bindung beteiligten Aminosäuren Met80 und His18 sind eingezeichnet; (b) Lysingruppen, die zu einer positiven Nettoladung von Cyt *c* führen sind eingezeichnet (blau/lila).

Die Aminosäuresequenz von Cyt *c* enthält eine Vielzahl von invarianten positiv geladenen Lysingruppen (Lys) [Timkovich 1975]. Eine Häufung findet sich in einem ringförmigen Bereich um die exponiert liegende Kante der Häm-Gruppe (Abbildung 2.5 b). Aufgrund dieser Lysine ergibt sich in diesem Bereich eine positive Nettoladung [Koppenol und Margoliash 1982], wodurch es zu elektrostatischen Wechselwirkungen mit Redoxpartnern von Cyt *c* kommen kann. Ferner wird vermutet, dass die Lysine zu einer geeigneten Orientierung der Häm-Gruppe vor einer Elektronentransferreaktion beitragen [Avila *et al.* 2000; Murgida und Hildebrandt 2001].

Die Elektronentransfereigenschaften von Cyt *c* sind von essentieller Bedeutung für den letzten Schritt der Zellatmung, der in den Mitochondrien eukaryotischer Organismen stattfindet. Innerhalb der inneren Mitochondrienmembran kommt es zur Endoxidation, bei der Reduktionsäquivalente oxidiert und die Elektronen über einen Multienzymkomplex auf gelösten Sauerstoff übertragen werden. Die dabei freigesetzte Energie wird zum Aufbau eines Protonengradienten über die Mitochondrienmembran genutzt, der schließlich zur Adenosintriphosphat (ATP) Synthese führt. ATP ist der wichtigste Träger chemischer Energie in Zellen. Die Vorgänge innerhalb der Atmungskette sind schematisch in Abbildung 2.6 gezeigt. Insgesamt sind vier Komplexe an der Endoxidation beteiligt. Die Oxidation von Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) erfolgt an Komplex I, der NADH

Dehydrogenase, die die Elektronen vom NADH auf Ubichinon (UQ) überträgt und die Protonen in den Intermembranenraum befördert. Weitere Elektronen werden von Komplex II, der Succinat-Dehydrogenase während der Oxidation von Succinat auf Ubichinon übertragen. Durch Elektronenaufnahme wird Ubichinon zu Ubichinol reduziert und diffundiert innerhalb der Membran zu Komplex III, der Cyt *c* Reduktase. Dieser Komplex wird auch als Cyt *bc*₁ bezeichnet, da er die Cytochrome Cyt *b*₅₆₂, Cyt *b*₅₆₆ und Cyt *c*₁ enthält. Darüber hinaus besteht der Transmembran-Komplex aus einem Eisen-Schwefel-Protein und mindestens sechs weiteren Proteinuntereinheiten. Der Elektronentransfer erfolgt in einem mehrschrittigen Prozess über die Häm-Gruppen der Cytochrome von Komplex III. Cyt *c* sitzt an der Membranaußenseite und ist in der Lage an Komplex III zu binden. Diese Bindung erfolgt über elektrostatische Wechselwirkung mit den positiv geladenen Lys Gruppen im Bereich der Häm-Gruppe von Cyt *c* [Dickerson und Timkovich 1975; Smith *et al.* 1976]. Hierdurch lagert sich Cyt *c* in definierter Orientierung an die Cyt *c* Reduktase an, sodass es zu einem Elektronentransfer von Komplex III auf Cyt *c* kommen kann und das Eisen der Häm-Gruppe reduziert wird ($\text{Fe}^{3+} + \text{e}^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}$). Während der Elektronenübertragung von UQ auf Cyt *c* kommt es auch bei Komplex III zum Protonentransfer über die Membran.

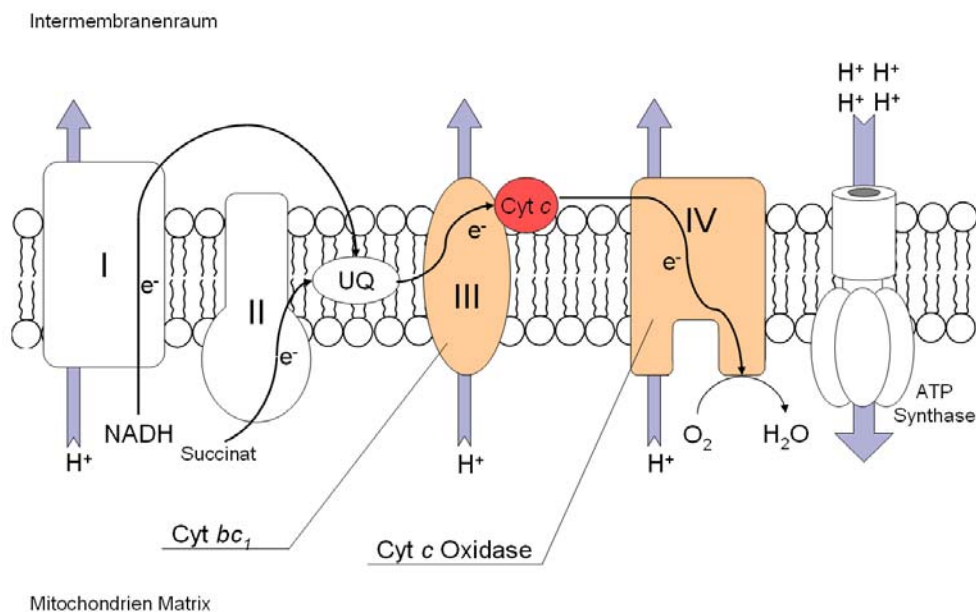


Abb. 2.6 Schematische Darstellung des Elektronen- und Protonenflusses über die vier Komplexe der Atmungskette. Cyt *c* fungiert als Elektronenüberträger zwischen Komplex III (Cyt *c* Reduktase) und Komplex IV (Cyt *c* Oxidase). Cyt *c* Oxidase reduziert schließlich O_2 zu H_2O . Der Protonengradient zwischen Intermembranenraum und Mitochondrien Matrix dient zur Synthese von ATP durch das Enzym ATP Synthase.

Das reduzierte Cyt *c* dissoziiert von Komplex III und diffundiert an der Membranaußenseite zu Komplex IV, der Cyt *c* Oxidase. Die Bindung an Komplex IV erfolgt wie zuvor an die Reduktase elektrostatisch. An der Bindung sind vermutlich die gleichen Lysine beteiligt. Cyt *c* Oxidase enthält zwei Cytochrome (Cyt *a* und Cyt *a*₃), die aus je zwei Häm-Gruppen bestehen und an verschiedene Regionen desselben Proteins gebunden sind. Des Weiteren enthält die Cyt *c* Oxidase zwei Kupfer-Ionen, die für die Übertragung der Elektronen auf O₂ entscheidend sind. Der Elektronenfluss von Cyt *c* zu O₂ durch Komplex IV führt abermals zu einer Protonenbewegung aus der Matrix in den Intermembranenraum. Mit dem Elektronentransport durch die Membran baut sich so ein Protonengradient auf. Dieser wird von der ATP Synthase zur Bildung von ATP genutzt. Die Atmungskette ist somit für die Bereitstellung dieses Energieträgers von zentraler Bedeutung.

Cyt *c* nimmt in der Elektronentransferkette eine zentrale Stellung ein, da es als Elektronenshuttle zwischen Komplex III und IV dient. Cyt *c* adsorbiert an die Außenseite der Mitochondrienmembran, wo es frei diffundieren kann. Durch Lysine an der Proteinoberfläche kann es elektrostatisch an Cyt *c* Reduktase und Cyt *c* Oxidase binden, wo es reduziert bzw. oxidiert wird. Neben Cyt *c* gibt es eine Vielzahl ähnlich aufgebauter Cytochrome, die in allen O₂ atmenden Organismen vorkommen und stets an Elektronentransferreaktionen beteiligt sind. Die genauen Vorgänge beim Elektronentransfer zwischen Redoxproteinen sind nicht vollständig verstanden. Cyt *c* ist somit ein ideales Modellprotein, um diese Elektronentransferreaktionen *in vitro* zu studieren. Es ist ein einfach aufzureinigendes Protein mit einer hohen thermodynamischen Stabilität [Butt und Keilin 1962]. Die geringe Größe, die hohe Löslichkeit, sowie der hohe Anteil helikaler Strukturen und nicht zuletzt das Eisenprotoporphyrin, erlauben eine Vielzahl spektroskopischer Untersuchungstechniken [Bertini *et al.* 2006]. Die positive Nettoladung ermöglicht darüber hinaus eine effiziente Immobilisierung auf Elektrodenoberflächen. Cyt *c* hat sich aufgrund seiner Eigenschaften und der einfachen Handhabung unter Biochemikern und Biophysikern zu einem beliebten Studienobjekt entwickelt und gehört mittlerweile zu den am besten untersuchten Redoxproteinen. Eine Vielzahl von Publikationen beschäftigt sich mit dem Elektronentransfer von immobilisiertem Cyt *c* und den Interaktionen mit Cyt *c* Oxidase *in vitro* [Haas *et al.* 2001; Heering *et al.* 2004; Ataka *et al.* 2004B]. Aufgrund seiner guten Elektronentransfereigenschaften und der einfachen Immobilisierbarkeit auf Elektrodenoberflächen, gehört Cyt *c* zu den vielversprechendsten Redoxproteinen für bioelektronische Anwendungen.

2.3 Immobilisierungsstrategien für Proteine

Die Immobilisierung von Proteinen ist für biotechnologische Anwendungen grundsätzlich von besonderem Interesse. Hierunter versteht man die teilweise oder vollständige Reduzierung der Beweglichkeit mit Hilfe physikalischer oder chemischer Methoden. Dieses kann entweder durch Einschluss von Proteinen z.B. in bestimmten Polymermatrices, oder durch Bindung an Trägermoleküle oder funktionalisierte Oberflächen erfolgen. Für bioelektronische Anwendungen ist vor allem die Immobilisierung an Oberflächen relevant. Je nach Verwendung kann das Ziel eine besonders hohe und spezifische Oberflächenbedeckung mit dem gewünschten Protein bzw. eine gewünschte Orientierung des Proteins an der Oberfläche sein. Ein häufiges Problem bei der Immobilisierung von Proteinen ist der teilweise oder vollständige Verlust der Proteinaktivität. Um die natürliche Funktionalität der Proteine zu erhalten, sollte die Immobilisierung auf der Oberfläche nicht zu Strukturänderungen oder Denaturierungseffekten führen. Für biosensorische Applikationen muss die Orientierung des Proteins auf der Oberfläche in der Regel so erfolgen, dass katalytisch aktive Bereiche oder Bindedomänen nicht blockiert werden. Neben der spezifischen Anforderung an die Oberflächenanbindung, wird die Wahl einer geeigneten Immobilisierungstechnik im Wesentlichen von den physikalisch-chemischen Eigenschaften von Protein und Oberfläche bestimmt. Bei der Oberflächenimmobilisierung kann die Proteindichte durch vorherige Beschichtung mit geordneten, selbstorganisierenden Monolagen (SAM) aus organischen Molekülen gesteigert und die Gefahr einer Denaturierung reduziert werden. Gleichzeitig erlaubt die Funktionalisierung der SAM Moleküle den Einsatz unterschiedlicher Bindungsreaktionen. Es wurde eine Vielzahl von unterschiedlichen Immobilisierungsstrategien für Proteine aller Art entwickelt, die sich im Wesentlichen in drei Kategorien einteilen lassen; der physikalischen, kovalenten und auf Bioaffinität beruhenden Immobilisierung [Rusmini *et al.* 2007].

2.3.1 Immobilisierung durch Physisorption

Proteine lassen sich aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften mittels Physisorption auf Oberflächen immobilisieren. Dieser Vorgang beruht auf physikalischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und Oberflächenmolekülen, die zur unspezifischen aktivierungsfreien Bindungen führen. Man unterscheidet im Wesentlichen elektrostatische, hydrophobe und polare Wechselwirkungen. Die stärksten Bindungskräfte lassen sich durch elektrostatische Bindungen erzielen. Die Art der intermolekularen Wechselwirkung, die für

eine Immobilisierung genutzt werden kann, hängt maßgeblich von der Beschaffenheit des jeweiligen Proteins und der Oberfläche ab. Beim Protein bestimmen primär die Seitengruppen der oberflächennahen Aminosäuren über die physikalischen Bindungseigenschaften. Aminosäuren wie Lysin, Arginin und Histidin tragen, bei entsprechenden pH Werten unterhalb ihres pK_a Wertes, positiv geladene Seitengruppen. Negativ geladene Seitengruppen finden sich bei deprotonierter Asparaginsäure und Glutaminsäure. Die ungleichmäßige Verteilung geladener Aminosäuren und die Ausbildung eines lokalen Ladungsüberschusses auf der Proteinoberfläche ermöglicht die elektrostatische Bindung des Proteins an entgegengesetzt geladene Oberflächen. Darüber hinaus unterscheidet man zwischen Aminosäuren mit polarem und hydrophobem Charakter. Befinden sich auf der Proteinoberfläche Domänen mit besonders vielen hydrophoben oder hydrophilen Aminosäuren, so lassen sich die Proteine auf entsprechend hydrophoben oder hydrophilen Oberflächen immobilisieren.

Die Oberflächen können mit funktionalisierten SAMs beschichtet werden, um eine Immobilisierung zu ermöglichen. Für die elektrostatische Immobilisierung müssen die SAM Moleküle eine geladene Kopfgruppe tragen. Hierfür kommen vor allem Aminogruppen und Carboxylgruppen in Betracht. Die Immobilisierung von Proteinen über positiv geladene Seitengruppen auf metallischen Oberflächen kann durch Beschichtung der Oberfläche mit Thioalkansäuren erreicht werden. Diese binden über die Thiolgruppe effizient an die Metalloberfläche und bilden homogene Monolagen [Song *et al.* 1993; Salomon 2005]. Hierdurch wird die metallische Oberfläche zugleich passiviert, wodurch die Gefahr einer Proteindenaturierung verringert wird. Alkoholische Kopfgruppen ermöglichen eine hydrophile Adsorption, wohingegen Methylengruppen die Anbindung hydrophober Aminosäuren begünstigen. Eine Orientierung von Proteinen ist bei der Physisorption nur dann möglich, wenn das Protein einen definierten Dipol aufweist. Sind jedoch mehrere etwa gleichberechtigte polare bzw. unpolare Bereiche auf der Oberfläche verteilt, so ist von einer zufälligen Orientierung oder abgeschwächten Bindung auszugehen. Darüber hinaus eignen sich diese Immobilisierungsstrategien nicht bei Verwendung bestimmter Puffer oder Detergenzien, da es dort zur teilweisen oder vollständigen Desorption kommen kann.

2.3.2 Kovalente Immobilisierungsstrategien

Häufig werden Proteine mit Hilfe kovalenter chemischer Bindungen an Oberflächen immobilisiert. Dieses geschieht durch Reaktionen frei zugänglicher funktioneller Gruppen exponiert liegender Aminosäuren mit speziell modifizierten Oberflächen oder Linkermolekülen. Die kovalente Immobilisierung bietet gegenüber der Physisorption den Vorteil einer irreversiblen Bindung, bei ebenfalls erreichbaren hohen Oberflächenbedeckungen [Rusmini *et al.* 2007]. Dafür kommt es in der Regel zu einer zufälligen Orientierung der Proteine an der Oberfläche, wenn gleichzeitig mehrere Bindungen zu identischen reaktiven Seitengruppen möglich sind. Eine definierte Orientierung kann durch Maskierungsreaktionen erreicht werden, oder wenn das Protein nur eine einzelne reaktive Aminosäure an seiner Oberfläche besitzt. Mit Hilfe spezieller kovalenter chemischer Reaktionen, lassen sich unter bestimmten Umständen auch gerichtete Immobilisierungen realisieren [Srivatsa *et al.* 1998]. Um die Funktionalität des Proteins zu bewahren, muss auch bei der kovalenten Immobilisierung darauf geachtet werden, dass eine Immobilisierung nicht über Aminosäuren erfolgt, die an der Aktivität des Proteins beteiligt sind oder in der Bindungsdomäne liegen. Es wurde eine Vielzahl von kovalenten Reaktionsmechanismen beschrieben [Hermanson 1996; Rusmini *et al.* 2007], mit denen sich Proteine meist ungerichtet, teilweise aber auch ortsspezifisch immobilisieren lassen. In dieser Arbeit sollen die am häufigsten zur kovalenten Immobilisierung von Proteinen eingesetzten Strategien kurz beschrieben werden. Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht über die funktionellen Gruppen, die innerhalb der Aminosäuresequenz von Proteinen für eine kovalente Immobilisierung in Betracht kommen und die für eine Bindung benötigte Oberflächenfunktionalisierung.

Tab. 2.1 Funktionelle Gruppen in Proteinen, die für eine kovalente Immobilisierung auf entsprechend funktionalisierten Oberflächen genutzt werden können [Rusmini *et al.* 2007].

Seitengruppe	Aminosäure	Oberflächenaktivierung
-NH₂	Lys	Carboxylgruppe Aktiver Ester (NHS) Aldehyd Epoxid
-SH	Cys	Maleimid Pyridyl/ Succinimid Disulfid
-COOH	Asp, Glu	Amin
-OH	Ser, Thr	Epoxid

Am häufigsten erfolgt die kovalente Kopplung von Proteinen über die Aminoseitengruppen von Lysinen, die fast immer exponiert an der Proteinoberfläche liegen. Es werden verschiedene Mechanismen zum kovalenten Anbinden von Aminen an unterschiedlich funktionalisierte Oberflächen beschrieben. Abbildung 2.7 zeigt eine der gängigsten Strategien zur Kopplung von Aminen bzw. Aminogruppen an carboxylterminierte Monolagen. Die Amin-Bindungs-Chemie basiert auf der chemischen Aktivierung der Oberflächengruppen mit 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid Hydrochlorid (EDC) und/oder N-Hydroxysuccinimid (NHS). Nach der Oberflächenaktivierung können Proteine in wässriger Lösung zugegeben werden, woraufhin es zur Reaktion mit nukleophilen Regionen innerhalb des Proteins und zur Ausbildung stabiler Amidbindungen kommt [Johnsson *et al.* 1991; Jiang *et al.* 2004].

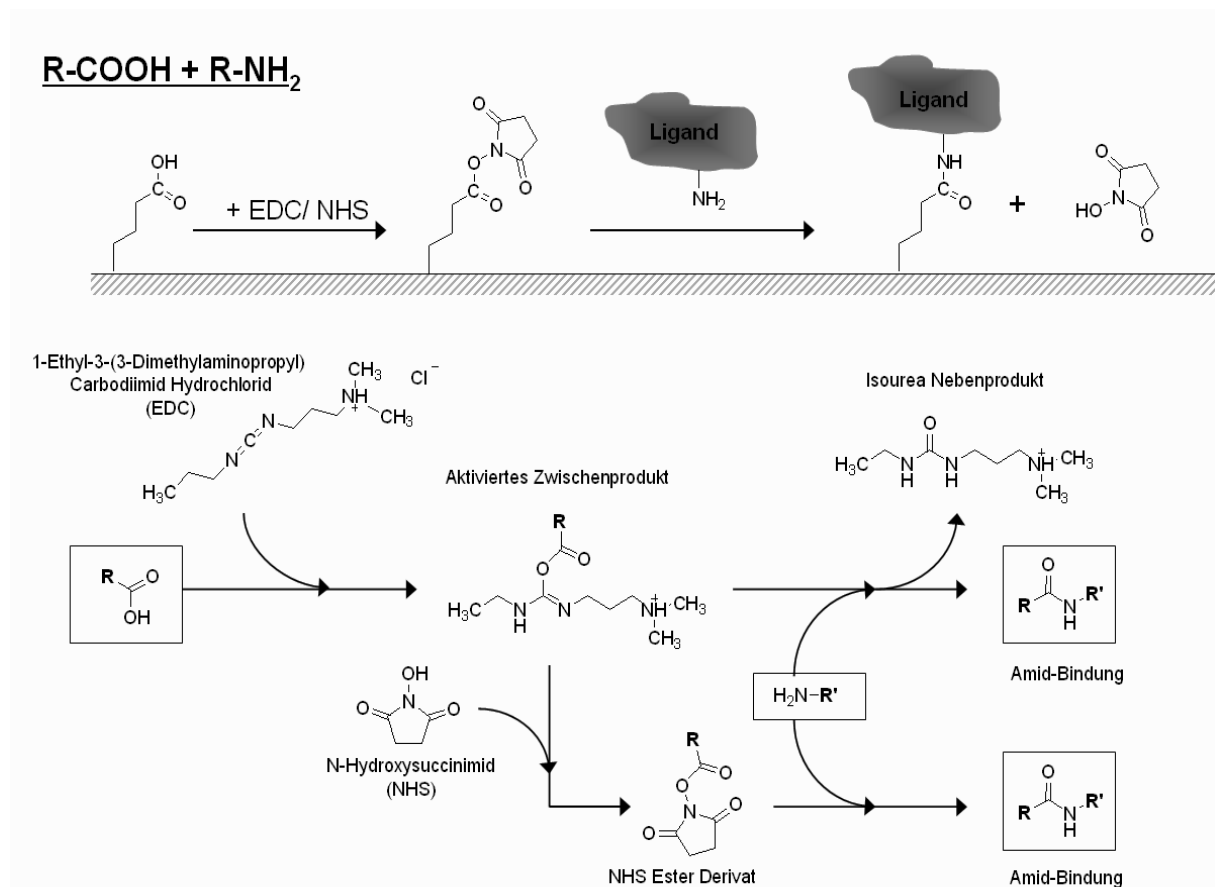


Abb. 2.7 Reaktionsschema der Amin-Bindungs-Chemie, basierend auf der Oberflächenaktivierung carboxylterminierter Oberflächen mit EDC und NHS.

Durch Aktivierung der Oberfläche mit EDC kommt es nach Zugabe eines primären Amins zur Ausbildung einer Amid-Bindung. Die Effizienz der Reaktion kann durch einen zusätzlichen

Reaktionsschritt nach der Oberflächenaktivierung mit EDC durch Zugabe von NHS deutlich gesteigert werden. Der Reaktionsmechanismus von EDC und NHS wurde von [Patel *et al.* 1997] für die Immobilisierung des Enzyms Katalase auf carboxylterminierten Oberflächen beschrieben. Eine alternative Strategie zur Immobilisierung von Proteinen über Aminogruppen basiert auf der Interaktion zwischen Aminen und Aldehyden. Beide funktionellen Gruppen reagieren zu einer schwachen Schiffschen Base, die sich durch Reduktion in eine stabile Amidbindung zweiter Ordnung umwandeln lässt [Betancor *et al.* 2006].

EDC und NHS können nicht nur zur Oberflächenaktivierung carboxylterminierter SAMs verwendet werden, sondern ermöglichen auch die Immobilisierung von Proteinen über interne Carboxylgruppen. Dieses ist von besonderem Interesse, da Glutaminsäure und Asparaginsäure, die häufig an der Oberfläche von Proteinen liegen, über eine freie Carboxylgruppe verfügen. In diesem Fall erfolgt die Aktivierung der Carboxylgruppen am Protein. Hierfür können ebenfalls EDC bzw. NHS oder andere Carbodiimid basierte Aktivatoren [Fernandez-Lafuente *et al.* 1993] verwendet werden. In diesem Fall muss die Substratoberfläche für die Ausbildung einer Bindung zur aktivierten Carboxylgruppe aminiert sein.

Eine spezifischere Immobilisierung ist durch Bindung über die Seitengruppen von Cystein möglich. Diese Aminosäure besitzt eine Thiolgruppe, über die es innerhalb des Proteins zwischen zwei Cysteinen zu Struktur stabilisierenden Disulfidbrücken kommen kann. Cysteine sind deutlich seltener als Lysine, sodass eine zufällige Orientierung der Proteine weniger wahrscheinlich ist. Die Oberfläche muss für die Bindung der Thiolgruppe einen geeigneten Reaktionspartner aufweisen. Am häufigsten werden hierfür Maleimid [Hermanson 1996; Viitala *et al.* 2000] oder ein pyridinylierter Disulfidlinker wie Pyridinyldithioethanamin (PDEA) verwendet. Abbildung 2.8 zeigt zwei Reaktionsschemen für die Immobilisierung eines Proteins über eine Thiolgruppe mit Hilfe von PDEA. Man unterscheidet zwischen der Ligand Thiol Chemie (Abb. 2.8 a) und der Oberflächen Thiol Chemie (Abb. 2.8 b). In beiden Fällen ist der Ausgangspunkt eine carboxylterminierte Oberfläche und ein zu immobilisierendes Protein (Ligand) mit freier Thiolgruppe. Die carboxylterminierte Oberfläche wird mittels EDC und NHS aktiviert. Bei der Ligand Thiol Chemie erfolgt die Bindung von PDEA an den NHS-Ester. Nach Zugabe des Proteins erfolgt die Spaltung der Disulfidbindung im PDEA und die Ausbildung einer neuen Disulfidbindung zum Liganden (Abb. 2.8 a). Im Gegensatz hierzu erfolgt die Bindung des Liganden bei der Oberflächen Thiol Chemie an eine Thiolgruppe an der Oberfläche. Ausgehend von einer

EDC/NHS aktivierten carboxylterminierten Oberfläche, kann die Funktionalisierung mit einer Thiolgruppe durch Zugabe von Cystamin und Dithioerythritol (DTE) erfolgen (Abb. 2.8 b). Für eine effiziente Immobilisierung muss die Thiolgruppe des Proteins mit PDEA reagieren. Die Immobilisierung erfolgt analog zur Ligand Thiol Chemie, durch Abspaltung des Pyridyls und Ausbildung einer neuen Disulfidbindung zum Oberflächenthio.

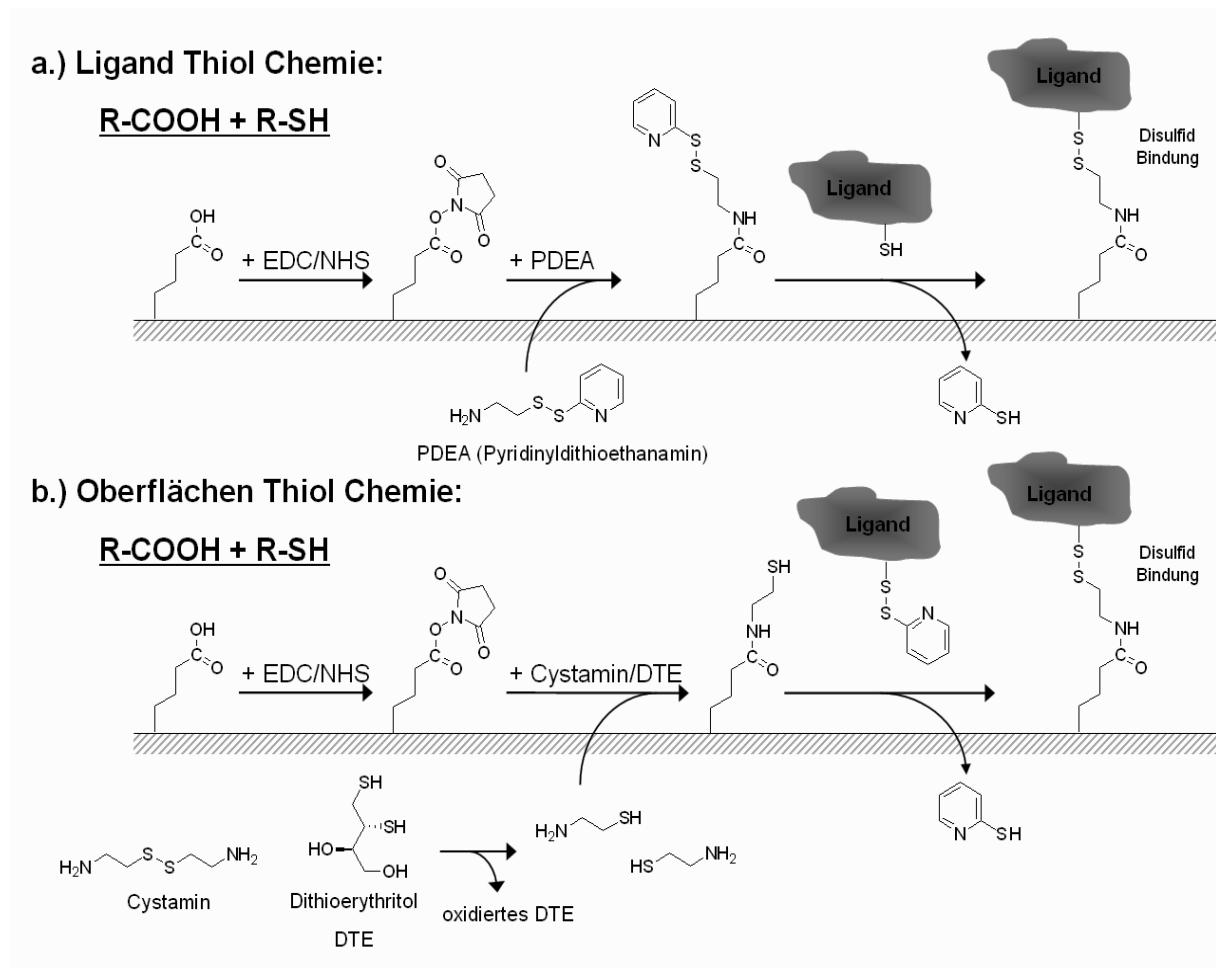
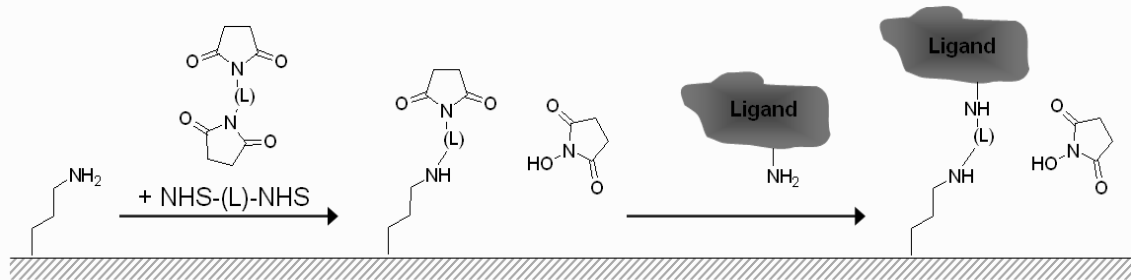


Abb. 2.8 Reaktionsschemen zur kovalenten Immobilisierung von Proteinen über Thiolgruppen: (a) Ligand Thiol Chemie, bei der die Thiolgruppe am Liganden vorliegt; (b) Oberflächen Thiol Chemie, bei der die Oberflächenmoleküle mit einer Thiolgruppe funktionalisiert werden.

Die kovalente Immobilisierung kann grundsätzlich auf zwei Arten erfolgen. Wird bei der Immobilisierung eines Liganden an eine Oberfläche kein Linkermolekül verwendet, so benutzt man den Begriff *Zero-Length Cross-Linking*. Häufig sind Oberflächenfunktionalität und funktionelle Proteingruppe nicht kompatibel. In diesem Fall verwendet man bifunktionelle Cross-Linker Moleküle. Je nachdem, ob die Linkermoleküle zwei gleiche oder unterschiedliche funktionelle Gruppen tragen, spricht man von homobifunktionalem Cross-

Linking oder heterobifunktionalem *Cross-Linking*. Es wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Cross-Linker Moleküle entwickelt, mit denen sich beliebige funktionelle Gruppen verknüpfen lassen [Hermanson 1996]. Das Funktionsprinzip von homobifunktionalen und heterobifunktionalen Cross-Linking Reaktionen ist schematisch in Abbildung 2.9 gezeigt.

a.) Homobifunktionales *Cross-Linking*: $R-NH_2 + R-NH_2$



b.) Heterobifunktionales *Cross-Linking*: $R-NH_2 + R-SH$

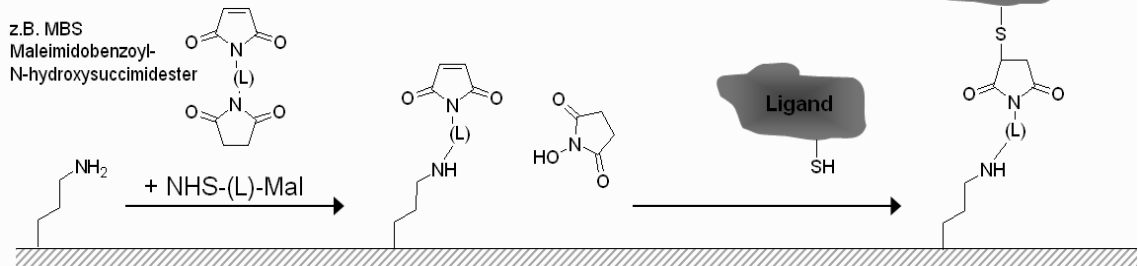


Abb. 2.9 Reaktionsschema einer homobifunktionalen *Cross-Linking* Reaktion (a) zweier funktioneller $-NH_2$ Gruppen, mit Hilfe eines homobifunktionalen NHS *Cross-Linkers*; (L) steht für einen nicht näher spezifizierten *Spacer* zwischen den beiden NHS-Gruppen. (b) Reaktionsschema einer heterobifunktionalen *Cross-Linking* Reaktion einer Amino- und einer Thiolgruppe, mit Hilfe eines heterobifunktionalen MBS *Cross-Linkers*.

Die hier beschriebenen Strategien geben exemplarisch die am häufigsten verwendeten Reaktionschemen wieder. In der Literatur finden sich unzählige Abwandlungen und alternative Strategien zur kovalenten Immobilisierung von Proteinen, wie etwa der Epoxid-Chemie, der Photoimmobilisierung oder der Bindung mittels Diels-Alder Zykladdition [Hermanson 1996; Rusmini *et al.* 2007], auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll.

2.3.3 Immobilisierung mittels Bioaffinität

Eine alternative Strategie zur Immobilisierung insbesondere rekombinanter Proteine basiert auf Bioaffinität. Dabei handelt es sich um spezifische Wechselwirkungen biologischer Moleküle, die zu sehr hohen Adsorptionskonstanten führen können. Aufgrund der hohen Spezifität erlaubt diese Immobilisierungsstrategie die Bindung des Proteins an der Oberfläche in gezielter Orientierung und unter milden Reaktionsbedingungen. Hierdurch können große und homogene Oberflächenbedeckungen erreicht werden. Die kontrollierte Immobilisierung auf Oberflächen ist ein entscheidender Vorteil gegenüber den meisten anderen Immobilisierungsstrategien. Ein weiterer Vorteil ist, dass es sich in den meisten Fällen um einen reversiblen Immobilisierungsprozess handelt. Durch Zugabe eines Kompetitors kann die Bindung gelöst und die immobilisierte Spezies freigegeben werden. Dieses ist insbesondere für Proteinaufreinigungen von großem Interesse. Ein entscheidender Nachteil ist, dass das Protein über eine spezifische Bioaffinitäts-Bindungsstelle (Tag) verfügen muss. Dieser Tag muss in der Regel mit Hilfe rekombinanter DNA-Techniken in die Aminosäuresequenz des Proteins eingebracht werden. Bei dem Tag handelt es sich vorwiegend um eine kurze Peptidsequenz, die für die Bioaffinität verantwortlich ist. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden lässt sich die für den entsprechenden Tag kodierende Nukleinsäuresequenz in das Proteingen einbringen. Die Lage des Tags innerhalb der Aminosäuresequenz muss so gewählt werden, dass die Funktion des Proteins nicht beeinträchtigt wird. Um dieses zu gewährleisten werden Tags fast immer N- oder C-terminal an das Protein angefügt. In einigen Fällen wird zwischen Protein-Terminus und Tag eine kurze Linker-Sequenz bestehend aus einigen Aminosäuren eingefügt, um den Abstand zwischen Protein und Tag zu vergrößern und sterische Effekte zu reduzieren. In der Literatur wird eine Vielzahl von Bioaffinitätstags beschrieben [Roy und Gupta 2006]. Die vier prominentesten Systeme sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Ein sehr häufig für die Immobilisierung, insbesondere aber zur Proteinaufreinigung benutztes Sequenzmotiv geht auf [Porath *et al.* 1975] zurück. Dabei benutzt man die Affinität zwischen Metall beladener Nitrilotriessigsäure (NTA) und einem sogenannten Histidin Tag (His Tag). Der His Tag besteht aus mindestens sechs Histidinen (His₆), die zumeist am N- oder C-Terminus des jeweiligen Proteins angefügt werden (Abbildung 2.10 a). Die Bindung eines His getaggen Proteins an eine NiNTA Matrix erfolgt durch Ausbildung einer Komplexbindung mit dem zweiwertigen Metallion [Terpe 2003]. Die Bindung erfolgt hochspezifisch und reversibel. Durch Zugabe eines Kompetitors wie Imidazol oder Chelatbildneren wie EDTA

lassen sich die immobilisierten Proteine gezielt freisetzen. NiNTA wird am häufigsten als Matrix zur Immobilisierung His getaggtter Proteine benutzt, die Ausbildung der Komplexbindung kann aber alternativ zu Ni^{2+} auch zu anderen zweiwertigen Metallionen erfolgen. Obwohl ursprünglich für die chromatographische Aufreinigung rekombinanter Proteine entwickelt, wird diese Methode mittlerweile auch für eine Vielzahl anderer Zwecke genutzt, so z.B. zur Immobilisierung der Proteine auf verschiedenen Oberflächen [Schmid *et al.* 1997; Nieba *et al.* 1997; Johnson und Martin 2005]. Hierzu muss die Oberfläche mit NiNTA funktionalisiert werden. Dieses kann durch kovalente Bindung von NTA über EDC und NHS an carboxylterminierte Oberflächen und anschließende Beladung mit Ni^{2+} erfolgen [Schmid *et al.* 1997; Gershon und Khilko 1995].

Ein anderes vielseitig genutztes Immobilisierungsverfahren bedient sich der Avidin-Biotin Wechselwirkung [Smith *et al.* 2006], die zu einer der stärksten bekannten, nicht-kovalenten Bindungen führt. Aufgrund der Spezifität der Bindungsreaktion ist es möglich, Proteine in gleichmäßiger Orientierung zu immobilisieren. Bei Avidin handelt es sich um ein aus vier Untereinheiten aufgebautes Glykoprotein, das wasserlöslich und innerhalb eines weiten pH Bereiches stabil ist. Es besitzt in jeder Untereinheit eine Bindungsstelle für Biotin. Die Bindung von Biotin erfolgt sehr schnell und wird nicht von Einflussfaktoren wie Temperatur, pH-Wert und anderen denaturierenden Agenzien beeinflusst [Rusmini *et al.* 2007]. Biotin ist ein natürlich vorkommendes Vitamin, bestehend aus einem bityklischen Ring mit Pentansäure als Substituent. An der Bindungsreaktion mit Avidin ist nur der bityklische Ring des Biotins beteiligt, sodass über die Carboxylgruppe vielfältige Modifikationen erfolgen können, um Proteine zu biotinylieren. Die Anbindung der Biotingruppe an Proteine (Biotinylierung) kann über kovalente *Cross-Linking* Reaktionen an entsprechende funktionelle Aminosäureseitengruppen erfolgen. Hier gibt es eine Vielzahl von chemisch modifizierten Biotin Varianten, am häufigsten kommen NHS Ester von Biotin zum Einsatz, um es an Aminogruppen zu koppeln [Luo und Walt 1989]. Durch chemische Biotinylierung ist es nicht erforderlich das Protein genetisch zu modifizieren, um einen Tag einzufügen. Da es sich bei Biotin um ein sehr kleines Molekül handelt, wird die Struktur und Funktion der Proteine im Allgemeinen nicht beeinträchtigt. Neben der Affinität von Biotin zu Avidin bindet es ebenfalls an Streptavidin. Dieses ist wie Avidin ein tetramerisches Protein und stammt aus dem Bakterienstamm *Streptomyces avidinii*. Es unterscheidet sich von Avidin aber durch Molekulargewicht, Aminosäurezusammensetzung und pI-Wert. Der isoelektrische Punkt von Streptavidin liegt im Gegensatz zu Avidin im neutralen pH Bereich. Da es sich bei Streptavidin um kein Glykoprotein handelt, und es eine geringere Gesamtladung trägt,

kommt es im Gegensatz zu Avidin, in Streptavidin Systemen seltener zu unspezifischen Bindungen. Neben der Möglichkeit biotinylierte Proteine an Avidin- oder Streptavidin-beschichtete Oberflächen zu immobilisieren, eignet sich das System auch zur Bindung auf biotinylierten Oberflächen. Da Avidin bzw. Streptavidin vier Biotin Bindestellen besitzt, kann es selbst als *Cross-Linker* eingesetzt werden. Neben der Bindung von Biotin an Streptavidin, wurde eine Peptidsequenz identifiziert, die ebenfalls eine hohe Bindungsaffinität zu Streptavidin aufweist [Schmidt und Skerra 2007]. Durch Anfügen eines 8 Aminosäuren umfassenden Strep Tags an die Aminosäuresequenz des zu immobilisierenden Proteins, lässt sich eine effiziente Bindung an Streptavidin realisieren (Abbildung 2.10 b).

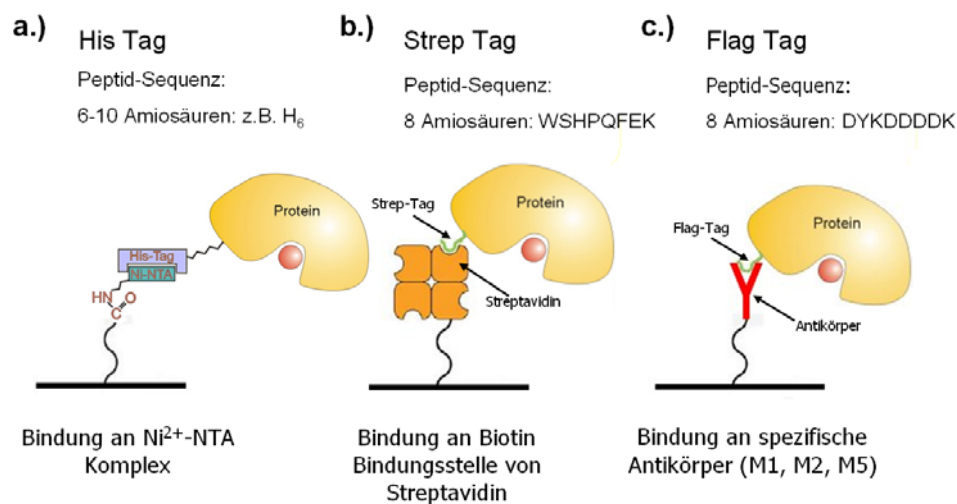


Abb. 2.10 Schematische Darstellung der Bindung über unterschiedliche Bioaffinitätstags. Die Aminosäurezusammensetzung der Tags ist im Einbuchstabencode angegeben: (a) His Tag; (b) Strep Tag; (c) Flag Tag.

Eine Immobilisierungsstrategie, die insbesondere im Bereich der molekularen Diagnostik Anwendung findet, basiert auf der Affinität zwischen Antikörpern und bestimmten Proteinen bzw. Peptiden [Lu *et al.* 1996]. Immunglobulin Antikörper lassen sich an Oberflächen immobilisieren, die mit Protein A oder Protein G beschichtet sind, da es zu einer spezifischen Interaktion mit der konstanten Region (Fc) der Antikörper kommt. Diese Immobilisierungsstrategie gewährleistet, dass die Bindungsstelle der Antikörper für ein spezifisches Antigen, die sich in der variablen Region (Fab) befindet, frei zugänglich bleibt. Ein Nachteil dieser Methode ist die fehlende Kontrollierbarkeit der Orientierung von Protein A auf der Oberfläche, die zu inhomogenen Bedeckungen mit dem Antikörper führen kann. Darüber hinaus können nur bestimmte Antikörper an Protein A bzw. Protein G binden, wodurch diese Strategie auf diese Klasse von Antikörpern beschränkt ist. Die spezifische Bindungsreaktion

zwischen Antikörper und Antigen kann ebenfalls zur Immobilisierung von Proteinen genutzt werden. Es können zu bestimmten Regionen des Zielproteins spezifisch bindende Antikörper gewonnen werden. Auf eine Oberfläche immobilisiert, binden die Antikörper spezifisch an diese Regionen. Die Identifizierung und Herstellung spezifischer Antikörper, insbesondere in großen Mengen ist jedoch sehr zeitaufwendig und kostspielig. Es gibt eine Reihe kommerzialisierter Systeme zur Immobilisierung rekombinanter Proteine (Tabelle 2.2). Hierbei wird den Proteinen ein spezifischer Tag, meist ein kurzes Peptid, bestehend aus wenigen Aminosäuren angehängt, der an einen spezifischen Antikörper binden kann. Abbildung 2.10 c zeigt das Prinzip exemplarisch am Flag Tag, der spezifisch an die Antikörper M1, M2 und M5 binden kann.

Tab. 2.2 Übersicht über konventionelle Immobilisierungstags mit spezifischen Bindungseigenschaften zu Antikörpern.

Tag	Antikörper Affinität	Peptid Sequenz
Flag Tag	M1, M2, M5 Antikörper	DYKDDDDK
HA Tag	HA Antikörper	TKDPSRVGYDVPDYAG
c-myc Tag	c-myc Antikörper	EQKLISEEDL
T7 Tag	T7 Antikörper	MASMTGGQQMG

Eine weitere Immobilisierungsstrategie für rekombinante Proteine basiert auf der spezifischen Bindung von Liganden. In den seltensten Fällen besitzt das Zielprotein selbst eine spezifische Bindestelle für einen Liganden. Durch Fusion eines bestimmten Proteins oder Enzyms an das zu immobilisierende Zielprotein, kann eine Ligandenbindung erreicht werden. Das Fusionsprotein wird in der Regel C-terminal an das Zielprotein angehängt. Hierzu müssen die Gene beider Proteine in einem Expressionssystem miteinander verknüpft werden. Besonders häufig werden Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose-Bindungsprotein (MBP) oder Xylanase als Fusionsprotein verwendet. GST bindet selektiv an Glutathion, MBP an Amylose und Xylanase an Cellulose. Durch Oberflächenbeschichtung mit diesen Liganden können hochspezifische Immobilisierungen realisiert werden. Ein Problem ist häufig die Größe der Fusionsproteine. Hierdurch kann es zu unerwünschten Beeinflussungen der Aktivität des Zielproteins und zu geringeren Oberflächenbedeckungen kommen.

Die Wahl einer geeigneten Immobilisierungsstrategie hängt maßgeblich von den spezifischen Anforderungen ab und muss für jede Anwendung und jedes zu immobilisierende Protein neu getroffen werden. Dabei sind Einflussfaktoren wie

Bindungsstärke, Bindungsspezifität, Bindungskinetik, Reversibilität, Abstand von der Oberfläche, Oberflächenorientierung und gegebenenfalls erforderliche Proteinmodifikationen zu berücksichtigen. Für bioelektronische Anwendungen muss zudem ein guter Elektronentransfer durch entsprechend vorhandene Ladungstransferpfade gewährleistet sein.

2.4 Ladungstransfer durch organische Moleküle

Bei der Kopplung organischer Moleküle an nanoskopische Elektroden ist es von großer Bedeutung die Mechanismen zu verstehen, die zu einem Ladungstransfer über die gebundenen Moleküle führen. Die elektrischen Eigenschaften eines Leiters werden bestimmt durch den Widerstand bzw. die Leitfähigkeit, in Abhängigkeit von Material, Querschnittsfläche und Länge. Die Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Länge ist dabei eine direkte Folge des Ladungstransfermechanismus. Bei makroskopischen, metallischen Leitern steigt der Widerstand linear mit der Länge. Grund hierfür ist die diffusive Natur des Ladungstransports in Metallen. Bei organischen Molekülen im Größenmaßstab weniger Nanometer, die in der Regel den Charakter eines Dielektrikums besitzen, gilt diese Abhängigkeit jedoch nicht. Hier folgt der Ladungstransfer anderen Mechanismen. Die Strom-/ Spannungs-Charakteristik wird bestimmt von Parametern wie Abstand im Metall/Molekül/Metall Kontakt, Konformation, Lücke zwischen *Highest Occupied Molecular Orbital* (HOMO) und *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* (LUMO), sowie der Stärke der elektrischen Kopplung und dem Elektrodenmaterial [Schwaab 2007]. Zur Aufklärung dieser Ladungstransfermechanismen bei organischen Molekülen wurde eine Vielzahl theoretischer [Segal *et al.* 2000] und experimenteller [Davis *et al.* 1998] Untersuchungen an Elektrode/Molekül/Elektrode Kontakten durchgeführt. Hierbei dienten Moleküle mit aliphatischen Alkylketten als Modellsystem, darunter insbesondere Alkanthiole, die auch in dieser Arbeit als SAM Moleküle zum Einsatz kamen.

Untersuchungen zum Ladungstransfer durch Alkanthiole erfolgten unter anderem mittels Rastertunnelmikroskopie, Kontakt-Rasterkraftmikroskopie (C-AFM), Nanoporen und *crossed-wire-junctions* [Wang *et al.* 2005]. Da es sich bei diesen Molekülen um klassische Isolatoren handelt [Davis *et al.* 2005], kommen für den Elektronentransfer zwischen zwei Elektroden unterschiedliche Tunnelmechanismen in betracht. Vom *Through-Space* Tunnelmechanismus spricht man, wenn die elektronischen Zustände des organischen Moleküls nicht am Ladungstransfer beteiligt sind und die Elektronen direkt von Elektrode zu Elektrode tunneln.

Bei einem Elektronentransfer unter Beteiligung der Orbitale des gebundenen organischen Moleküls, wird der Tunnelprozess als *Through-Bond* Mechanismus bezeichnet. Es wurde gezeigt, dass bei Alkanthiolen neben dem direkten Tunneln keine anderen Elektronentransferprozesse, wie resonantes Tunneln, thermionische Emission oder *Hopping* stattfinden [Wang *et al.* 2003]. Grundsätzlich muss davon ausgegangen werden, dass Elektronen sowohl nach dem *Through-Bond*, als auch *Through-Space* Mechanismus parallel tunneln, sodass sich ein interferierender Tunnelstrom aus beiden Mechanismen ergibt. Beim Ladungstransfer durch ungesättigte Kohlenwasserstoffe wird jedoch angenommen, dass der *Through-Bond* Mechanismus dominiert [Wang *et al.* 2003]. Damit es zum *Through-Bond* Elektronentransfer kommen kann, müssen die Molekülorbitale mit den Energiezuständen am Fermi-niveau des Elektrodenmaterials wechselwirken können. Hierfür ist erforderlich, dass der Abstand zwischen der Energie des tunnelnden Elektrons und der HOMO-LUMO-Zustände des organischen Moleküls möglichst klein ist [Salomon 2005].

Ein Modell, mit dem sich nichtresonantes Tunnelverhalten für Metall/Molekül/Metall Systeme beschreiben lässt, wurde von [Simmons 1963] entwickelt. Untersuchungen des Ladungstransfers in Abhängigkeit der Tunnelstanz zeigten, dass der Tunnelstrom exponentiell mit der Molekülkettenlänge abnimmt [Wold *et al.* 2002; Wang *et al.* 2003; Davis *et al.* 2005; Choi *et al.* 2008]. Die Untersuchungen von [Cui *et al.* 2001] zeigten, dass auch die Bindungszustände Einfluss auf den Tunnelprozess haben. So kommt es bei kovalent an die Elektrode gebundenen Molekülen zu einem um mehrere Größenordnungen höheren Tunnelstrom, als bei nicht oder nur schwach gebundenen Molekülen. Die Höhe des jeweiligen Tunnelstroms hängt von der Stärke der elektronischen Kopplung ab. So ergibt sich beispielsweise für Schwefel ein niedrigerer Kontaktwiderstand zu Gold als für Stickstoff, dessen Wert wiederum niedriger ist, als für die Bindung einer COOH-Gruppe an Gold [Chen *et al.* 2006].

Ein sehr effizienter Ladungstransfer, auch über größere Distanzen, erfolgt in organischen π -konjugierten Molekülen, wie etwa aromatischen Verbindungen. Während bei kurzkettigen Molekülen der direkte Tunnelprozess dominiert, kommt es bei länger-kettigen π -konjugierten Systemen zu einem inkohärenten *Hopping* Mechanismus. Zu dem *Hopping* Transport kommt es, sobald die konjugierte Brücke länger als 2,5 nm ist [Davis *et al.* 1998]. Hierdurch ergibt sich für länger-kettige Moleküle wieder eine lineare Abhängigkeit des Tunnelstroms, die den Ladungstransfer entlang organischer Molekülstrukturen über größere Distanzen erlaubt. Kommt es jedoch zu einer Unterbrechung der π -konjugierten Molekülkette, etwa durch einzelne gesättigte Molekülbausteine, so erhöht sich der Widerstand und es kommt zu einem

deutlich verringerten Tunnelstrom [Choi *et al.* 2008]. Der Ladungstransfer durch langkettige Moleküle hängt somit stark von der Bindungsarchitektur ab. Der *Hopping* Mechanismus ist von zentraler Bedeutung für den Ladungstransfer durch Biomoleküle, wie DNA und Proteine. Gerade Proteine, die aufgrund ihrer Größe und Zusammensetzung die Eigenschaften eines strukturlosen Dielektrikums haben [Davis *et al.* 2008], lassen einen Ladungstransfer allein durch direktes Tunneln nicht zu. Stattdessen wird angenommen, dass der Ladungstransfer entlang spezifischer Elektronentransferpfade erfolgt. Dabei handelt es sich vermutlich um eine Kombination aus *Hopping* zwischen benachbarten aromatischen Aminosäuregruppen, *Through-Bond* und *Through-Space* Tunnelereignissen [Willner und Katz 2005].

Organische Moleküle mit redoxaktiver Gruppe können ebenfalls zu einem effizienteren Ladungstransfer führen. Aus diesem Grunde sind Redoxproteine für die molekulare Bioelektronik von besonderem Interesse. In Gegenwart eines für Elektronen zugänglichen Redoxzentrums, lässt sich unter bestimmten Voraussetzungen ein zweistufiger Tunnelprozess beobachten [Tao *et al.* 2000; Kitagawa *et al.* 2005; Davis *et al.* 2008]. Durch Anlegen einer Gate-Spannung im Bereich des Formalpotentials des Redoxproteins, kommt es zur temporären Oxidation oder Reduktion des Redoxzentrums. Im Folgeschritt tunneln die Elektronen vom Redoxzentrum weiter zur zweiten Elektrode. Dieser Prozess, der auch als resonantes Tunneln bezeichnet wird, äußert sich in einer deutlichen Steigerung des Tunnelstromes. Er ist für die molekulare Elektronik von Bedeutung, da sich bei gebundenen redoxaktiven Molekülen in einer 3-Elektrodenanordnung der Ladungstransfer durch Anlegen einer Spannung modulieren lässt. Hierdurch können molekulare Bauelemente realisiert werden, die einer resonanten Tunneldiode entsprechen.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Gerätename	Gerätebezeichnung; Hersteller	Institut
Analysenwaage I	AB 104-S Analysenwaage [Mettler-Toledo; Giessen, D]	IBN-2
Analysenwaage II	AE 240 Analysenwaage [Mettler-Toledo; Gießen, D]	INB-1
Autoklav I	TECNOCLAV 50 [Integra Biosciences; Fernwald, D]	INB-1
Autoklav II	Systec V150 [Systec GmbH; Wettenberg, D]	INB-1
Blotting-Maschine	Gel Dryer 583 [Bio-Rad Laboratories GmbH; München, D]	INB-1
Brutschrank	Kühlbrutschrank KB 115 [Binder GmbH; Tuttlingen, D]	INB-1
DNA Gelelektrophorese Apparatur	Compact XS/S [Biometra; Göttingen, D] Gene Power Supply GPS 200/400 [Pharmacia; Uppsala, SWE]	INB-1
Fineplacer	Fineplacer [Finetech GmbH & Co KG; Berlin, D]	IBN-2
Impedanzspektroskopie	Impedance/ Gain-Phase Analyzer SI 1260 [Solartron Analytical; Shildon, UK]	IBN-2
Oberflächenplasmon-Resonanz Spektrometer (SPR)	Biosuplar 3 SPR Reflectometer [Analytical µ-Systems / Mivitec GmbH; Sinzig, D]	IBN-2
PCR Thermocycler I	Cetus DNA Thermal Cycler [Perkin Elmer; Waltham, MA, USA]	INB-1
PCR Thermocycler II	T3000 Thermocycler [Biometra; Göttingen, D]	INB-1
pH-Meter I	SevenMulti S47 [Mettler-Toledo; Giessen, D]	IBN-2
pH-Meter II	pH-Meter 713 [Metrohm GmbH; Filderstadt, D]	INB-1
Potentiostat I	EG&G Modell 283 [Princeton Applied Research; Princeton, USA]	IBN-2
Potentiostat II	Autolab PGSTAT 302 [Eco Chemie B.V.; Utrecht, NL]	IBN-2
Probestation	PM5 Probesttion [SUSS Microtec; Garching, D]	IBN-2
Protein Gelelektrophorese Apparatur	Minigel-Twin [Biometra; Göttingen, D] Standard Power Pack P25 [Biometra; Göttingen, D]	INB-1
Pumpe für SPR	Peristaltische Pumpe REGLO Digital ISM834A [Ismatec SA; Zürich, CH]	IBN-2
Rasterelektronenmikroskop	GEMINI 1550 [LEO Elektronenmikroskopie GmbH; Oberkochen, D]	IBN-2
Rasterkraftmikroskop	MultiMode AFM / STM (Veeco / Digital Instruments; Santa Barbara, CA, USA)	IBN-2
Rotationsschüttler	Roller Drum [New Brunswick Scientific; Edison, NJ, USA]	INB-1

Gerätename	Gerätebezeichnung; Hersteller	Institut
Schüttelinkubator I	Certomat R + Certomat H [B. Braun Biotech International; Melsungen, D]	INB-1
Schüttelinkubator II	Unitron INFORS [Unitron; Einsbach, D]	INB-1
Semiconductor Analyzer	4200 Semiconductor Analyzer + Vorverstärker [Keithley Instruments; Cleveland, OH, USA]	IBN-2
Spektrophotometer I	Ultraspec 3000 [Pharmacia Biotech; Uppsala, SWE]	INB-1
Spektrophotometer II (UV-Vis)	Lambda 900 [Perkin Elmer; Waltham, MA, USA]	IBN-2
Ultraschallaufschluss	Sonifier - Cell Disruptor B-12 [Branson Sonic Power Company; Danbury, USA]	INB-1
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 SH [BANDELIN electronic GmbH & Co. KG; Berlin, D]	IBN-2
UV-Transilluminator	UV-Transilluminator [UVP, Inc.; Cambridge, UK]	INB-1
Waage	JB3002-G/FACT [Mettler-Toledo; Giessen, D]	INB-1
Wasserstoffgenerator	Hotflame 350 [Vetter-Technik GmbH; Königsbach-Stein, D]	IBN-2
Zentrifuge I	Sorvall Evolution RC [Thermo Fisher Scientific; Langenselbold, D]	INB-1
Zentrifuge II	Sigma 3-16K [Sigma Laborzentrifugen GmbH; Osterode am Harz, D]	INB-1
Zentrifuge III (Tischzentrifuge)	Sigma 2K15 [Sigma Laborzentrifugen GmbH; Osterode am Harz, D]	INB-1
Zentrifuge IV (Tischzentrifuge)	Eppendorf Centrifuge 5415C [Eppendorf; Hamburg, D]	INB-1

3.2 Chemikalien

Alle aufgelisteten Chemikalien wurden in p.A. Qualität ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Chemikalienname	Abkürzung	Summenformel	Hersteller
Adenosintriphosphat	ATP	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	Sigma-Aldrich [München, D]
Agar	-	-	Sigma-Aldrich [München, D]
Agarose	-	$C_{12}H_{18}O_9$	Invitrogen [Paisley, UK]
Amberlite CG-50	-	-	Fluka [Neu-Ulm, D]
Ammoniumhydroxid	-	NH_4OH	Riedel-de Haën [Seelze, D]
Ammoniumperoxodisulfat	APS	$H_8N_2O_8S_2$	Sigma-Aldrich [München, D]
Ammoniumsulfat	-	$(NH_4)_2SO_4$	Sigma-Aldrich [München, D]
Ampicillin Natriumsalz	-	-	Sigma-Aldrich [München, D]
Argon (99,999%)	-	Ar	Air Products GmbH [Hattingen, D]
Baktotrypton	-	-	AppliChem GmbH [Darmstadt, D]
BIO RAD Protein Assay	-	-	Bio-Rad Laboratories GmbH [München, D]
Bromphenolblau	-	-	Merck [Darmstadt, D]
Chloroform	-	$CHCl_3$	Merck [Darmstadt, D]
Cytochrom c (horse heart)	Cyt c	-	Sigma-Aldrich [München, D]
Cytochrom c Reduktase (porcine heart)	-	-	Sigma-Aldrich [München, D]
Dimethylsulfoxid	DMSO	C_2H_6OS	Riedel-de Haën [Seelze, D]
Dithiobis(N-succinimidylpropionat)	DTSP	$C_{14}H_{16}N_2O_8S_2$	Fluka [Neu-Ulm, D]
Dithioerythrit	DTE	$C_4H_{10}O_2S_2$	Sigma-Aldrich [München, D]
Essigsäure	-	$C_2H_4O_2$	KMF GmbH [Lohmar, D]
Ethanol (reinst)	EtOH	C_2H_5OH	KMF GmbH [Lohmar, D]
Ethidiumbromid	-	$C_{21}H_{20}N_3Br$	AppliChem GmbH [Darmstadt, D]
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Sigma-Aldrich [München, D]
Ethylenglycoldiamintetraessigsäure	EGTA	$[CH_2OCH_2CH_2N(CH_2CO_2H)_2]_2$	Sigma-Aldrich [München, D]
6-(Ferrocenyl)hexanthiol	FcHxT	$C_{16}H_{22}FeS$	Sigma-Aldrich [München, D]
(D+) Glucose Monohydrat	-	$C_6H_{12}O_6 \cdot xH_2O$	AppliChem GmbH [Darmstadt, D]

Chemikalienname	Abkürzung	Summenformel	Hersteller
Glycerin	-	$C_3H_8O_3$	KMF GmbH [Lohmar, D]
Gly-Gly Hydrochlorid	-	$C_4H_8N_2O_3 \cdot xHCl$	Sigma-Aldrich [München, D]
Gold Einkristall	Au(111)	Au	FZ-Jülich
Golddraht	-	Au	Chempur [Karlsruhe, D]
Gold Nanopartikel Lösung (5 nm) ~0,01% $HAuCl_4$	Au_{Nano}	Au	Sigma-Aldrich [München, D]
Hefeextrakt	-	-	AppliChem GmbH [Darmstadt, D]
1-Hexanthiol	HxT	$CH_3(CH_2)_5SH$	Fluka [Neu-Ulm, D]
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES	-	Sigma-Aldrich [München, D]
Imidazol	-	$C_3H_4N_2$	Fluka [Neu-Ulm, D]
Immersionsöl für SPR (1,61)	-	-	Cargille Laboratories [Cedar Grove, NJ, USA]
Isopropanol	-	C_3H_7OH	KMF GmbH [Lohmar, D]
Kaliumacetat	KAc	$C_2H_3KO_2$	AppliChem GmbH [Darmstadt, D]
Kaliumcarbonat	-	K_2CO_3	Sigma-Aldrich [München, D]
Kaliumchlorid	-	KCl	Merck [Darmstadt, D]
Kaliumdicyanogold	Pur-A-Gold	$K[Au(CN)_2]$	Enthone GmbH [Langenfeld, D]
Kaliumhexacyanoferrat(II) Trihydrat	-	$C_6FeK_4N_6 \cdot 3H_2O$	Fluka [Neu-Ulm, D]
Kaliumhexacyanoferrat(III)	-	$C_6FeK_3N_6$	Fluka [Neu-Ulm, D]
Kaliumhydrogencarbonat (p.A.)	-	$KHCO_3$	Sigma-Aldrich [München, D]
Kaliumhydroxid (p.A.)	-	KOH	Merck [Darmstadt, D]
Kalziumchlorid Dihydrat	-	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Merck [Darmstadt, D]
Lithiumchlorid	-	LiCl	Merck [Darmstadt, D]
Magnesiumchlorid	-	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Merck [Darmstadt, D]
2-Mercaptobenzoessäure (p.A.)	2-MBA	$HSC_6H_4CO_2H$	Sigma-Aldrich [München, D]
3-Mercaptobenzoessäure (p.A.)	3-MBA	$HSC_6H_4CO_2H$	Sigma-Aldrich [München, D]
4-Mercaptobenzoessäure (p.A.)	4-MBA	$HSC_6H_4CO_2H$	ABCR GmbH & Co KG [Karlsruhe, D]
2-Mercaptoethanol (p.A.)	MEOH	HSC_2H_4OH	Sigma-Aldrich [München, D]
16-Mercaptohexadecansäure	MHDA	$HS(CH_2)_{16}OH$	Sigma-Aldrich [München, D]
6-Mercaptohexanol (p.A.)	MHOH	$HS(CH_2)_6OH$	Sigma-Aldrich [München, D]

Chemikalienname	Abkürzung	Summen- formel	Hersteller
6-Mercaptohexansäure (p.A.)	MHA	$\text{HS}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$	Sigma-Aldrich [München, D]
15-Mercaptopentadecansäure	MPDA	$\text{HS}(\text{CH}_2)_{15}\text{OH}$	Sigma-Aldrich [München, D]
4-Mercatophenol (p.A.)	MPhOH	$\text{HS C}_6\text{H}_5\text{O}$	Sigma-Aldrich [München, D]
3-Mercaptopropanol (p.A.)	MPOH	$\text{HS}(\text{CH}_2)_3\text{OH}$	Sigma-Aldrich [München, D]
3-Mercaptopropionsäure (p.A.)	MPA	$\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	Sigma-Aldrich [München, D]
11-Mercaptoundecanol (p.A.)	MUOH	$\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$	Sigma-Aldrich [München, D]
11-Mercaptoundecansäure (p.A.)	MUA	$\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Sigma-Aldrich [München, D]
Microperoxidase-11	MP-11	-	Sigma-Aldrich [München, D]
N(α),N(α)-Bis(carboxymethyl)-L- lysinhydrat	ANTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	Fluka [Neu-Ulm, D]
Natriumchlorid	-	NaCl	KMF GmbH [Lohmar, D]
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	-	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	Fluka [Neu-Ulm, D]
Natriumdithionit	-	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	Riedel-de Haën [Seelze, D]
Natriumdodecylsulfat	SDS	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$	AppliChem GmbH [Darmstadt, D]
di-Natriumhydrogenphosphat Dodecahydrat	-	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot x12\text{H}_2\text{O}$	Fluka [Neu-Ulm, D]
Natriumhydroxid (p.A.)	-	NaOH	Merck [Darmstadt, D]
Nickel(II)-sulfat	-	NiSO_4	Sigma-Aldrich [München, D]
β -Nicotinamidadenindinukleotid	NADH	$\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2$	Sigma-Aldrich [München, D]
Phenol	-	$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$	Roth [Karlsruhe, D]
Phosphorsäure	-	H_3PO_4	KMF GmbH [Lohmar, D]
Platindraht	-	Pt	Chempur [Karlsruhe, D]
Salzsäure	HCl	HCl	Merck [Darmstadt, D]
Schwefelsäure	-	H_2SO_4	Riedel-de Haën [Seelze, D]
SPT-0012A	SPT12	$\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{C}\text{H}_2)_6\text{OCH}_2\text{COOH}$	SensoPath Technologies Inc. (Bozeman, MT, USA)
Tetramethylethylendiamin	TEMED	$\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$	Fluka [Neu-Ulm, D]
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Tris	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	AppliChem GmbH [Darmstadt, D]
1-Undecanthiol	UDT	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{SH}$	Sigma-Aldrich [München, D]
Xylencyanol	-	$\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}_2$	Sigma-Aldrich [München, D]
Wasser	MilliQ	H_2O	Entionisiertes Milli-Q Wasser ($18,2\text{M}\Omega\text{cm}^{-1}$; 4-7 ppb TOC) Millipore [Billerica, USA]
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	H_2O	Bidestilliertes Wasser (INB-1)

3.3 Puffer und Medien

Natriumphosphatpuffer

Für die Untersuchungen mit Cyt c wurde ein Natriumphosphatpuffer benutzt. Hierfür wurden NaH_2PO_4 und Na_2HPO_4 in einem Molverhältnis von $\text{Na}_2\text{HPO}_4 : \text{NaH}_2\text{PO}_4 = 0,63$ gemischt, um bei einer Säurekonstanten von $\text{pK}_a = 7,2$ einen pH von 7 zu erhalten. Die Feineinstellung des pH-Wertes erfolgte mittels pH-Meter durch Zugabe geringer Mengen NaOH bzw. H_3PO_4 . Die Ionenstärke des Puffers betrug 5,78 mM und berechnete sich nach Gleichung 3.1, wobei z_i die Ladung der Ionensorte i , und c_i ihre Konzentration ist.

$$I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 c_i \quad (3.1)$$

TE-Puffer

EDTA	1 mM	
Tris/HCl	10 mM	pH 7,4

LB-Medium

Die Bestandteile für Flüssigmedien wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Im Anschluss wurde das Medium 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Die Lagerung des Mediums erfolgte bei RT.

Baktotrypton	1,0% (w/v)
NaCl	1,0% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar zugegeben. Nach dem Abkühlen des Agars auf ca. 50°C wurden 9 cm Petrischalen mit ca. 20 ml Medium befüllt. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 4°C.

Terrific Broth Medium

Als Medium für die bakterielle Expression von Cyt c wurde Terrific Broth verwendet. Hierzu wurden die Medienbestandteile wie unten angegeben zunächst in 9/10 Volumenteilen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf RT wurde dem Medium 1/10 Volumen an separat autoklaviertem Kaliumphosphatpuffer über einen Sterilfilter zugegeben.

Terrific Broth Medium:

Baktotrypton 1,2% (w/v)

Hefeextrakt 2,4% (w/v)

Glycerin 0,4% (v/v)

Zugabe nach dem Autoklavieren:

KH_2PO_4 0,17 M

K_2HPO_4 0,72 M

Vor der Anzucht der Bakterien wurde dem Medium Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) zugegeben.

Antibiotika-Stammlösungen

Für die Ampicillin-Stammlösung wurden 100 mg/ml Ampicillin in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

3.4 Expressionssystem

Im Rahmen dieser Arbeit kam ein bakterielles Expressionssystem zur rekombinanten Herstellung von Pferdeherz Cytochrom c (Cyt c) zum Einsatz, das von [Rumley *et al.* 2002] entwickelt wurde. Es wurden Ausbeuten von bis zu 65 mg Cyt c pro Liter Kulturvolumen beschrieben [Rumley *et al.* 2002].

3.4.1 Expressionsvektor

Für die Expression von Pferdeherz Cyt c in *Escherichia coli* (*E. coli*) wurden uns zwei rekombinante Expressionsvektoren von Dr. Jon Rumley zur Verfügung gestellt [Rumley *et al.* 2002]. Abbildung 3.1 zeigt die Karte des rekombinanten Expressionsvektors pJRhrsN2. Die vollständige Sequenz des Vektors ist im Anhang angegeben. Das Plasmid trägt ein Gen für Wildtyp Pferdeherz Cyt c und ein weiteres für das Enzym Hämylase aus der Hefe. Dieses

Konstrukt gewährleistet die Expression von Cyt *c* mit korrekt eingebauter Häm-Gruppe [Pollock *et al.* 1998]. Die Ampicillinresistenz wird durch das β -Lactamasegen (Amp^R) vermittelt. Die Proteinexpression wird durch den lac Promotor P(lac) gesteuert, der unmittelbar neben der Ribosomenbindungsstelle liegt.

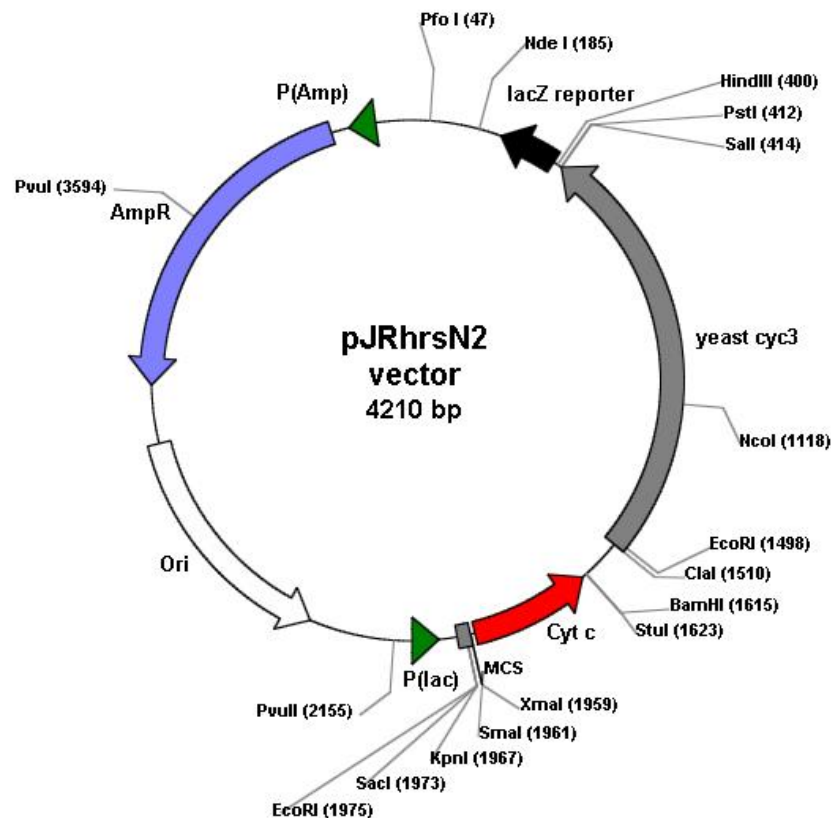


Abb. 3.1 Plasmid Karte des rekombinanten Cyt *c* Expressionsvektors pJRhrsN2. Das von [Rumbley *et al.* 2002] entwickelte auf dem pUC Plasmid basierende Plasmid trägt die Gene für Pferdeherz Cyt *c* und Hämylase aus Hefe (yeast *cyc3*), sowie ein β -Lactamasegen zur Vermittlung der Ampicillinresistenz (Amp^R).

Der zweite Expressionsvektor basiert auf pJRhrsN2, enthält jedoch ein modifiziertes Cyt *c* Gen (opticyt_c). Durch vollständige Neusynthese des Gens wurden 69 der 105 Kodons ausgetauscht, um eine bessere Expression in *E. coli* zu erreichen. Vier Aminosäuren sind im Vergleich zur Wildtypsequenz mutiert (V3P; K72Q; K73A; K79R). N-terminal ist ein His₆ Affinitätstag über eine Faktor Xa Protease-Schnittstelle und Glutamin an die Proteinsequenz angefügt [Rumbley *et al.* 2002]. Das so veränderte Gen (Abbildung 3.2) wurde über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und BamHI in den Vektor pJRhrsN2 kloniert und trägt die Bezeichnung pJRopti1. Die vollständige Sequenz ist im Anhang angegeben.

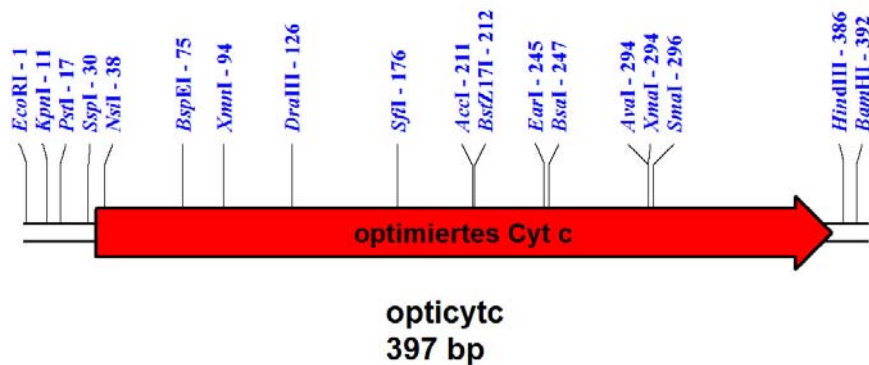


Abb. 3.2 Karte des synthetischen, von [Rumbley *et al.* 2002] entwickelten, optimierten Cyt c Gens. Charakteristische Restriktionsschnittstellen sind angegeben.

3.4.2 Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue

Der kompetente Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue [Bullock *et al.* 1987] wurde zur Anreicherung von Plasmid-DNA benutzt.

Der Genotyp dieses *E. coli* Stammes lautet: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (r_K^- , m_K^+), *supE44*, *relA1*, *lac* [*F'* *proAB*, *lacI^q*Δ*M15*, *Tn10* (*Tet^r*)].

E. coli BL21-CodonPlus-RIL

Zur Expression des rekombinanten Proteins wurde der *E. coli* Stamm BL21-CodonPlus-RIL der Firma Stratagene verwendet, der auf hohe rekombinante Proteinexpressionsraten optimiert ist.

Der Genotyp dieses Stammes lautet: *E. coli* B F^- , *ompT*, *hsdS*(r_B^- m_B^-) *dcm⁺*, *Tet^r*, *gal*, *endA*, *Hte*, [*argU ileY leuW Cam^r*].

3.5 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden

3.5.1 Kultivierung von Bakterien

Plattenkultur

E. coli Zellen wurden auf festen ampicillinhaltigen LB-Medien aerob bei 37°C inkubiert bis einzelne Kolonien zu erkennen waren. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 4°C.

Plasmidpräparation

E. coli Zellen einer Bakterienkolonie wurden in LB Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) zur Zellvermehrung in einem Rotationsinkubator oder im Warmluftschüttler über Nacht (ÜN) bei 37°C inkubiert.

Expression

Die Expression von rekombinantem Cyt c erfolgte aerob in 2 l Schüttelkolben mit 1000 ml ampicillinhaltigem Terrific Broth Medium im Warmluftschüttler bei 30°C für 50 h. Die Kultur wurde mit 1 ml einer ÜN Vorkultur angeimpft. Nach der Expression wurden die Zellen mittels Zentrifugation pelletiert und bei -20°C eingefroren.

3.5.2 Rekombinante DNA-Techniken

Plasmid-DNA Präparation

Mini-Präparation durch alkalische Lyse

Für die Präparation kleinerer Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die Methode nach [Birnboim und Doly 1979] verwendet. Hierzu wurden die Bakterienzellen aus 1,5 ml einer ÜN Kultur durch Zentrifugation (14000 g; 1 min; RT) pelletiert und in 100 µl Lösung I resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung II zugegeben und vorsichtig durch Invertieren gemischt. Hierdurch kommt es zur alkalischen Lyse der Zellen, wobei die chromosomale DNA an der Zellwand gebunden bleibt. Um Zelltrümmer und Proteine zu präzipitieren, wurden 150 µl Lösung III zugegeben, durch Invertieren gemischt und für 3 min zentrifugiert (14000 g; RT). Nach einer Phenol-/Chloroformextraktion der wässrigen Phase

(siehe unten), wurden die Nukleinsäuren durch Zugabe von 1 ml Ethanol präzipitiert und zentrifugiert (14000 g; 2 min; RT). Anschließend wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

Lösung I:

50 mM Glucose

25 mM Tris/HCl pH 7,5

10 mM EDTA

Lösung II:

0,2 M NaOH

1 % SDS

Lösung III:

3 M KAc pH 4,8

Midi- und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde die LiCl Präparation verwendet. Für die Midi-Präparation wurden die Bakterienzellen aus einer 50 ml ÜN Kultur mittels Zentrifugation pelletiert (5000 g; 10 min; 4°C), in 4 ml Lösung I resuspendiert und durch Zugabe von 8 ml Lösung II lysiert. Anschließend wurden 8 ml Lösung III zugegeben, um Proteine, chromosomale DNA und SDS auszufällen. Nach Zentrifugation (5000 g; 10 min; RT) und Filtration des Überstandes wurde die wässrige Phase mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und erneut zentrifugiert (5000 g; 10 min; 4°C). Das Nukleinsäurepellet wurde in 1,45 ml H₂O und 50 µl 1 M Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. RNA wurde durch Zugabe von 2,5 ml 4 M LiCl gefällt und pelletiert (5000 g; 5 min; 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und mit dem 3-fachen Volumen Ethanol versetzt. Die ausgefallenen Nukleinsäuren wurden pelletiert (5000 g; 10 min; 4°C), getrocknet, in 200-300 µl TE-Puffer resuspendiert und mit 2-3 µl RNase-Cocktail (Applied Biosystems/ Ambion; Austin, TX, USA) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mittels Phenol-/Chloroformextraktion (siehe unten) und Ethanol-Präzipitation (siehe unten) gereinigt. Das Pellet wurde getrocknet und in 100-200 µl TE-Puffer aufgenommen.

Für Maxi-Präparationen wurden 250 ml Bakterienkulturen verwendet und pelletiert (5000 g; 10 min; 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 15 ml Lösung I resuspendiert und anschließend zunächst 30 ml Lösung II und dann 30 ml Lösung III zugegeben. Nach Zentrifugation (5000 g; 10 min; RT) und Filtration wurden die Nukleinsäuren im Überstand durch Zugabe von 110 ml Isopropanol ausgefällt und pelletiert (5000 g; 10 min; 4°C). Das Pellet wurde in 2,9 ml H₂O_{bidest} gelöst und 5 ml 4 M LiCl, sowie 100 µl 1 M Tris/HCl pH 7,5 zugegeben. Es wurde erneut zentrifugiert (5000 g; 5 min; 4°C) um ausgefallene RNA zu pelletieren. Aus dem Überstand wurde anschließend durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens Ethanol die Plasmid-DNA ausgefällt und mittels Zentrifugation pelletiert (5000 g; 10 min; 4°C). Das Pellet wurde in 200-500 µl TE-Puffer resuspendiert, 2-3 µl RNase-Cocktail zugegeben und für

30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Phenol-/Chloroformextraktion (siehe unten). Die gereinigte Plasmid-DNA wurde durch Zugabe des 3-fachen Volumens Ethanol und 1/10 Volumen LiCl aus dem wässrigen Überstand ausgefällt und mittels Zentrifugation pelletiert (5000 g; 5 min; 4°C). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, abermals zentrifugiert (5000 g; 3 min; 4°C) und der Überstand abgesaugt. Das leicht getrocknete Plasmid-DNA Pellet wurde in 100-300 µl TE-Puffer gelöst.

Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren

Phenol-/ Chloroformextraktion

Die Phenol-/Chloroformextraktion wurde verwendet, um DNA-Lösungen von Verunreinigungen wie Proteinen und Membranbestandteilen zu reinigen. Die DNA-Lösungen wurden mit dem gleichen Volumen einer 1:1 Mischung aus Phenol und Chloroform versetzt, gut durchmischt und die Phasen mittels Zentrifugation (15000 g; 3 min; RT) voneinander getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert, um Phenolreste zu entfernen. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von Ethanol präzipitiert.

Ethanol-Präzipitation

Mit Hilfe definierter Salz- und Alkoholkonzentrationen lässt sich DNA aus einer Lösung präzipitieren und somit anreichern. Hierfür wurde die DNA-Lösung auf eine KAc-Konzentration von 0,3 M (pH 4,8) eingestellt und mit dem 2,5-fachen Volumen absoluten Ethanols versetzt, kurz gemischt und für ca. 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die präzipitierte DNA mittels Zentrifugation pelletiert (15000 g; 4°C; 10 min), wobei die Zentrifugationszeit an die vorhandene DNA-Menge angepasst wird. Je geringer die DNA Konzentration bzw. Größe, desto länger muss zentrifugiert werden. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in TE-Puffer aufgenommen.

Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von Nukleinsäuren wurde die Agarose-Gelelektrophorese benutzt. Es wurde eine Agarosekonzentration von 2% (w/v) zur Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten mit weniger als 500 Basenpaaren (Bp) bzw. eine Konzentration 0,75% (w/v) zur Auftrennung größerer Fragmente (bis 10000 Bp) eingesetzt. Die Agarose wurde in 1x TBE-Puffer bis zum vollständigen Lösen aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf etwa 60°C mit 1 µg Ethidiumbromid pro ml versetzt. Die Gel-Lösung wurde

anschließend in einen Gelträger mit eingesetztem Probenkamm zur Aussparung der Probentaschen gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde dieses in die Elektrophoresekammer eingesetzt, mit 1x TBE-Puffer überschichtet und die mit 1/5 Volumen Farbmarker versetzten Nukleinsäure-Proben aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 90-120 V bis zur ausreichenden Trennung der Nukleinsäuren durchgeführt. Aufgrund der Anfärbung der Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid konnten diese unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar gemacht werden.

TBE-Puffer (10x):

Tris-Base 121,1 g

Borsäure 61,8 g

EDTA 7,4 g

ad. 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ Farbmarker:

100 mM EDTA

20% (w/v) Ficoll 400

0,01% Bromphenolblau

0,01% Xylencyanol

Quantifizierung von Nukleinsäuren

Durch gleichzeitiges Auftragen eines Größen- und Mengenstandards ließen sich anhand der Lage und Intensität der Banden im Agarosegel Fragmentgrößen und Menge der aufgetragenen DNA abschätzen.

Als Größen- und Mengenstandard wurde mit EcoRI/HindIII geschnittene λ -DNA (MBI Fermentas; Vilnius, Litauen) mit einer Konzentration von 67 ng/ μl eingesetzt. Die Bandenverteilung in einem 1%igen Agarosegel ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

Fragmentgrößen mit Fragmentkonzentrationen in Klammern (ng): 21226 Bp (218,8), 5184 Bp (53,1), 4973 Bp (51,3), 4268 Bp (44,0), 3530 Bp (36,4), 2027 Bp (20,9), 1904 Bp (19,6), 1584 Bp (16,3), 1375 Bp (14,2), 947 Bp (9,8), 831 Bp (8,6), 564 Bp (5,8), 125 Bp (1,5)

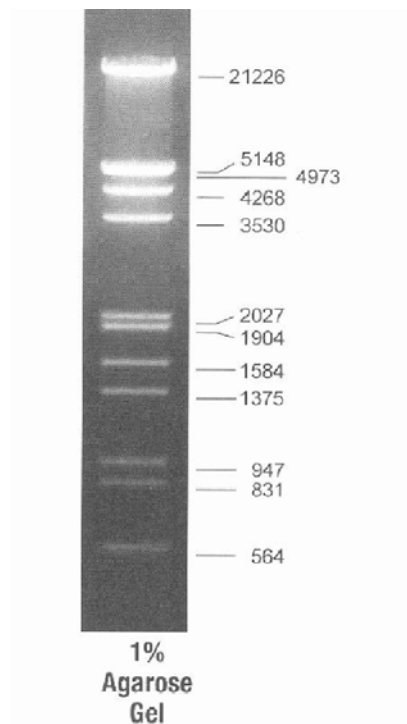


Abb. 3.3 Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker in 1% Agarosegel. Gesamtkonzentration der aufgetragenen DNA: 0,5 µg.

Elution von DNA aus Agarosegelen

Zur Präparation von DNA aus Agarosegelen wurde die Zentrifugationsmethode [Heery *et al.* 1990] verwendet. Dabei wurde der Deckel eines Eppendorf Reaktionsgefäßes entfernt und der Boden mit einer Kanüle durchstoßen. In das Eppendorf Reaktionsgefäß wurde anschließend silanisierte Glaswatte gefüllt und das ausgeschnittene Agarosegelstück darauf platziert. Das so vorbereitete Reaktionsgefäß wurde in ein zweites Eppendorf Reaktionsgefäß gesetzt und in einer Eppendorfzentrifuge zentrifugiert (7000 g; 5 min; RT). Das Eluat enthielt das DNA-Fragment. Die Ausbeute dieser Methode liegt zwischen 30% und 50%.

Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (**P**olymerase **C**hain **R**eaction, PCR) handelt es sich um eine effektive Methode zur Amplifikation spezifischer DNA Sequenzen *in vitro* [Mullis *et al.* 1986]. Die DNA Amplifikation erfolgt dabei in einer sich wiederholenden Abfolge von 3-Schritten. Die essentiellen Komponenten, die für die PCR Reaktion benötigt werden, sind (1) ein Paar synthetischer Oligonukleotid Primer (~20 Nukleotide), die komplementär zu Bereichen auf je einem der Matrizen DNA Stränge sind und den zu amplifizierenden

DNA-Abschnitt flankieren; (2) die Matrizen-DNA die zwischen den beiden Primern liegt und zwischen 100 und 35000 Bp lang sein kann; (3) eine thermostabile DNA-Polymerase, die Temperaturen von 95°C widerstehen kann; (4) die vier Desoxyribonukleotide [Glick und Pasternak 2003].

Der erste Schritt einer PCR besteht in der thermischen Denaturierung des Matrizen DNA-Stranges. Hierzu wird die Temperatur im Reaktionsgefäß kurzzeitig (~1 min) auf 95°C erhöht. Im zweiten, dem Annealing- oder Hybridisierungsschritt, kommt es bei Temperaturen um die 55°C zum Primer-Annealing, dem komplementären Anlagern der Primer an den Matrizen-Strang. Während dem dritten, dem Syntheseschritt, wird die Temperatur auf 72°C erhöht, dem Temperaturoptimum der thermostabilen DNA-Polymerase. In diesem Schritt wird die Matrizen-DNA vervielfältigt. Mit jedem PCR Zyklus kommt es zu einer Verdopplung der DNA-Menge.

Design und Synthese von Oligonukleotid Primern

Durch Verwendung speziell synthetisierter Oligonukleotid Primer, mit einer nicht zum Matrizen-Strang komplementären Sequenz am 5' Ende des Primers, lassen sich mittels PCR zusätzliche Nukleotide an den Matrizenstrang anfügen. Diese Form der Vorgehensweise wurde verwendet, um unterschiedliche für Affinitätstags kodierende Sequenzen an den Matrizen-Strang anzufügen.

Die Oligonukleotid Primer wurden von TIB MOLBIOL GmbH (Berlin) bezogen. Die Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Oligonukleotide sind unter Kapitel 4.2.1 aufgeführt.

Spezifikationen für die PCR

Die Reaktionen erfolgten in einem „Cetus DNA Thermal Cycler“ (Perkin Elmer) oder in einem „T3000 Thermocycler“ (Biometra). Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA bei 94°C für 2,5 min denaturiert. Während der Zyklen wurde jeweils für 0,5 min denaturiert und hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur wurde so gewählt, dass sie 2-3°C unter der niedrigeren Schmelztemperatur (T_m) der beiden Primer lag, die nach folgender Formel berechnet wurde, wobei A, T, G, C der Anzahl der entsprechenden Nukleotide entspricht:

$$T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Die Strangverlängerung erfolgte für 0,5 min bei einer Temperatur von 72°C. Es wurden insgesamt 30 Zyklen durchgeführt. Die verwendete DNA-Polymerase war die Thermoprime

Plus DNA-Polymerase der Firma Applied Biosystems/ Ambion (Austin, TX, USA) mit dem dazugehörigen Puffer. Ein 50 µl PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

0,5-5 ng	Plasmid-DNA
je 200-500 ng	spezifischer Primer
5 µl 10x	PCR-Puffer
5 µl 25 mM	MgCl ₂
0,7 µl 20 mM	dNTP
1 U	Thermoprime Plus DNA-Polymerase

Wurde die PCR im „Cetus DNA Thermal Cycler“ (Perkin Elmer) durchgeführt musste der PCR Ansatz noch mit 30 µl mineralischem Öl überschichtet werden.

PCR-Produkte wurden mittels Phenol-/Chloroformextraktion und Ethanol-Präzipitation gereinigt.

Klonieren von DNA Fragmenten

Das Klonieren von DNA-Fragmenten, sowie die Transformation von *E. coli* erfolgte nach [Sambrook *et al.* 1989].

Restriktionsverdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Um ein mittels PCR hergestelltes rekombinantes DNA-Fragment in einen Plasmid-Vektor einklonieren zu können, musste sowohl das PCR-Produkt, als auch der Plasmid-Vektor mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten werden. Hierzu wurden die Ansätze in 1x Inkubationspuffer (New England Biolabs; Ipswich, MA, USA) bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Inkubationen mit mehreren Restriktionsendonukleasen erfolgten bei übereinstimmenden Pufferbedingungen und Inkubationstemperaturen gleichzeitig. Es wurden stets 3-5 U Enzym/µg DNA eingesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass das Volumen der eingesetzten Nukleasen 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreitet, da das Glycerin im Aufbewahrungspuffer der Enzyme inhibitorische Wirkung hat. Tabelle 3.1 zeigt eine Übersicht der eingesetzten Restriktionsendonukleasen. Restriktionsansätzen mit Plasmid-DNA wurde zusätzlich 0,5-1 µl RNase-Cocktail (Applied Biosystems/ Ambion; Austin, TX, USA) zugegeben. In einigen Fällen war eine Zugabe von BSA zum Restriktionsansatz erforderlich.

Tab. 3.1 Übersicht über die eingesetzten Restriktionsenzyme und deren Bezugsquelle

Enzym	Hersteller
EcoRI	Roche Diagnostics [Mannheim, D]
BamHI	Roche Diagnostics [Mannheim, D]
KpnI	New England Biolabs [Ipswich, MA, USA]

Nach dem Restriktionsverdau der Plasmid-DNA wurden die kompatiblen Enden mit alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics; Mannheim, D) dephosphoryliert, um ein Religieren der Enden zu vermeiden. Hierzu wurden etwa 5 µg geschnittene Vektor-DNA, 10 µl 10x Phosphatasepuffer und 2 U alkalische Phosphatase mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und 1 h bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 1/10 Volumen EGTA (0,5 M) und 20 min Inkubation bei 65°C wurde die Reaktion gestoppt. Die dephosphorylierte Vektor-DNA wurde mittels Phenol-/Chloroformextraktion und Ethanol-Präzipitation gereinigt und anschließend bei 4°C gelagert.

Phosphatase-Puffer (10x):

500 mM Tris/HCl pH 8,5

1 mM EDTA

Ligation

Das Enzym T4-DNA-Ligase ist in der Lage DNA, die mit demselben Restriktionsenzym geschnitten wurde, wieder zu verknüpfen. Für die Ligation wurden etwa 50 ng geschnittener und dephosphorylierter Vektor und ein 3-5-facher molarer Überschuss an geschnittenem PCR-Fragment in 1x Ligasepuffer gemischt. Dem Ligationsansatz wurden 0,5 µl 10 mM ATP, sowie 1 µl T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics; Mannheim, D) zugegeben und der Ansatz bei RT für 2-3 h inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug 15 µl.

Ligase-Puffer (10x):

600 mM Tris/HCl pH 7,5

50 mM MgCl₂

10 mM DTE

10 mM ATP

Transformation

Für die Transformation wurden kompetente Zellen verwendet (siehe Kapitel 3.4.2). Der Ligationsansatz wurde zu 100 µl gefrorenen Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz kurzzeitig 1-2 min bei 37°C inkubiert und danach sofort ausplattiert. Hierfür wurden auf 37°C temperierte LB-Agarplatten (100 µg Ampicillin/ml) verwendet. Die Platten wurden anschließend ÜN bei 37°C inkubiert.

Um Plasmid-DNA erneut von Bakterien amplifizieren zu lassen, eignet sich die sogenannte „Retransformation“. Hierbei wurden 0,5-1 µl der Plasmid-DNA mit 50-150 µl kompetenten Bakterien vermischt und dieser Ansatz mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz direkt auf 37°C warme LB-Agarplatten mit Antibiotikum plattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C ÜN.

3.5.3 Protein Aufreinigung

Zellaufschluss

Das bei -20°C gelagerte Zellpellet wurde zunächst für 15 min auf Eis aufgetaut und anschließend in 2 mL Lysepuffer pro Gramm Feuchtgewicht resuspendiert.

Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall (Sonifier - Cell Disruptor B-12) mit einem Mikroaufsatz über den mit 3-4 Wiederholungen jeweils 20 Sekunden dauernde Ultraschallstöße von 200-300 Watt gegeben wurden. Zwischendurch wurden die Zellen für 30 Sekunden auf Eis gestellt. Die Zelltrümmer wurden vom enzymhaltigen Überstand durch Zentrifugation abgetrennt.

Ionenaustauschchromatographie

Aufgrund ihrer Nettoladung lassen sich Proteine mittels Ionenaustauschchromatographie trennen. Cyt c besitzt bei pH 7,0 eine positive Nettoladung aufgrund eines Überschusses positiv geladener Lysine [Timkovich 1975]. Hierdurch wird die Aufreinigung dieses Proteins mittels Kationenaustauschchromatographie möglich. Das positiv geladene Protein bindet in einer Chromatographiesäule an eine Trägersubstanz mit Carboxylatgruppen, wohingegen neutrale und negativ geladene Proteine die Säule passieren können. Nach dem Waschen lässt sich das gebundene Protein durch Erhöhung der NaCl Konzentration im Puffer eluieren,

da die positiven Natriumionen mit den positiv geladenen Gruppen des Proteins um die Bindungsstellen in der Säule konkurrieren.

Zur Aufreinigung von Cyt c ohne His Tag wurde eine Säule mit einem Durchmesser von 0,7 cm und einer Länge von 10 cm zu etwa 2/3 mit dem in Waschpuffer aufgeschwemmten Kationenaustauscher Amberlite CG50 befüllt, mit Waschpuffer äquilibriert und anschließend das Cyt c enthaltende Lysat auf die Säule gegeben. Das positiv geladene Cyt c verbleibt aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen mit den Carboxylatgruppen des Amberlite CG-50 in der Säulenmatrix. Die Säule wurde anschließend mit 2-5 Säulenvolumen Waschpuffer gespült, bevor das Protein durch Zugabe von 1-2 Säulenvolumen Elutionspuffer mit hoher Salzkonzentration eluiert wurde. Es wurden Eluatfraktionen zu je 1 ml gesammelt. Da davon ausgegangen werden musste, dass auch andere Proteine mit positiver Nettoladung im Eluat vorhanden waren, wurden die Fraktionen mit Ammoniumsulfat gefällt und anschließend dialysiert (siehe unten).

Lyse-/Waschpuffer:

20 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0

Elutionspuffer:

20 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0

0,5 M NaCl

Affinitätschromatographie

Eine weitere effiziente Methode zum Aufreinigen von Proteinen ist die Affinitätschromatographie. Hierbei nutzt man die Affinität eines Proteins zu einer bestimmten Substanz, um das Protein selektiv an das Säulenmaterial zu binden. Das Protein lässt sich durch Zugabe eines Kompetitors von der Säule eluieren.

Rekombinantes Cyt c mit His Tag wurde mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die endständige His₆ Sequenz des rekombinanten Proteins hat Affinität zu den Ni²⁺ Ionen eines Komplexes aus Nitrilotriessigsäure (NTA) und Nickel. Aufgrund dieser sehr spezifischen und selektiven Affinität werden rekombinante Proteine häufig zu Aufreinigungszwecken mit einem His Tag versehen. An NiNTA gebundene Proteine lassen sich durch Zugabe hoher Konzentrationen Imidazol eluieren, da dieses ebenfalls an NiNTA bindet. Zur Aufreinigung wurde eine Fertigsäule (Bio-Rad GmbH; München, D) mit 2 ml einer 50%igen NiNTA Agarosegel-Lösung (Qiagen; Hilden, D) gefüllt, wodurch sich ein Säulenvolumen von etwa 1 ml ergab. Die Aufreinigung erfolgte überwiegend bei 4°C, lediglich die Elution wurde bei RT durchgeführt. Das Säulenmaterial wurde zunächst mit dem 10-fachen Säulenvolumen H₂O gewaschen und anschließend mit dem gleichen Volumen Lysepuffer äquilibriert. Im nächsten

Schritt wurde das Lysat auf die Säule aufgetragen und Proben des Durchflusses genommen. Nach dem Waschen mit dem 10-fachen Säulenvolumen an Waschpuffer, wurde das gebundene Protein durch Zugabe von 5 ml Elutionspuffer eluiert und in Fraktionen zu je 1 ml aufgefangen. Proben der Waschfraktionen wurden ebenfalls für weitere Untersuchungen aufbewahrt.

Die Eluatfraktionen mit den höchsten Cyt c Konzentrationen wurden zum Entfernen des Imidazols dialysiert bzw. ggf. zuvor mit Ammoniumsulfat gefällt (siehe unten).

<u>Lysepuffer:</u>	<u>Waschpuffer</u>	<u>Elutionspuffer:</u>
300 mM NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl
50 mM NaH ₂ PO ₄	50 mM NaH ₂ PO ₄	50 mM NaH ₂ PO ₄
10 mM Imidazol	20 mM Imidazol	250 mM Imidazol
pH 8,0	pH 8,0	pH 8,0

Lyse- und Waschpuffer wurden vor Benutzung 1/500 Volumen Proteaseinhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) zugegeben.

Ammoniumsulfatfällung

Die Löslichkeit eines Proteins in einem Lösungsmittel wird durch die Interaktionen zwischen den Molekülen und Ionen des Lösungsmittels mit den geladenen Oberflächengruppen des Proteins bestimmt. Durch Zugabe eines die Löslichkeit verändernden Zusatzes kann erreicht werden, dass Proteine aggregieren und aus der Lösung ausfallen. Eine häufig angewendete Methode zur Proteinaufreinigung ist die fraktionierte Fällung durch Zugabe anorganischer Salze, wie Ammoniumsulfat. Ammoniumsulfat eignet sich besonders gut, da die meisten Proteine vor einer Denaturierung in Ammoniumsulfatlösung geschützt werden. Durch das Salz wird den Proteinen die Hydrathülle entzogen. Die Proteinmoleküle binden aneinander und bilden ein Agglomerat, welches sich beim Abzentrifugieren im Pellet absetzt. Dabei bestimmen Anzahl und Fläche der hydrophoben Bereiche auf der Proteinoberfläche das Aussalzverhalten.

Cyt c ist aufgrund seiner vielen polaren Aminosäuren an der Oberfläche ein polares Protein und daher sehr gut wasserlöslich. Zur weiteren Aufreinigung eignete sich daher die Ammoniumsulfatfällung besonders gut, da hierbei alle weniger löslichen Proteine ausgefällt werden konnten. Hierzu wurde der Proteinlösung, wie bei [Rumbley *et al.* 2002] beschrieben, Ammoniumsulfat bis zum Erreichen von etwa 55% Sättigung (0,35 g/ml) zugefügt. Die

Lösung wurde für 5-10 min auf Eis inkubiert, dann zentrifugiert (14000 g; 5 min; RT). Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet verworfen. Um das Salz zu entfernen wurde der Überstand mit dem darin gelösten Cyt c dialysiert (siehe unten).

Entsalzen durch Dialyse

Die Dialyse durch eine semipermeable Membran eignet sich, um kleine Moleküle wie z.B. Salze zu entfernen. Moleküle, die größer als der Porendurchmesser der Membran sind, werden von der Membran zurückgehalten, wohingegen kleine Moleküle und Ionen die Membran ungehindert passieren können. Aus diesem Grunde wurden die Fraktionen mit rekombinantem Cyt c nach der Elution bzw. nach der Ammoniumsulfatfällung dialysiert, um die Salze zu entfernen.

Die Eluatfraktionen, die hohe Konzentrationen von Cyt c enthielten, wurden in 1 ml Dialysiertubes (D-Tube Dialyzer Midi, Novagen) mit 6-8 kDa Ausschlussvolumen gefüllt und in 4 l 5,78 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0 unter Rühren für 24 h dialysiert. Der Puffer wurde während der Dialyse einmal erneuert.

Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte photometrisch nach [Bradford 1976] mit der „*Microassay Procedure*“ des Biorad-Handbuchs. Jeweils 800 µl der mit H₂O_{bidest} verdünnten Probe wurden mit 200 µl Biorad-Reagenz versetzt. Nach etwa 5 min Inkubationszeit erfolgte die photometrische Messung bei 595 nm. Die Kalibrierung erfolgte mit BSA (NEB; Schwalbach, D) im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 8 µg Protein.

Trennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und so die unterschiedlichen Fraktionen der Protein-Aufreinigung auf den Gehalt des rekombinanten Proteins untersucht. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgt nach der Größe der Proteine in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel. Es bestand aus einem 5%igen Sammelgel und einem 15%igen Trenngel. Die Gelelektrophorese wurde nach der Methode von [Lämmli 1970] in einer „Minigel Twin“-Kammer (Biometra) mit den Gelmaßen 0,1 x 8 x 10 cm durchgeführt. Hierzu wurden die Proteinproben der einzelnen Fraktionen mit reduzierendem 1x SDS-Probenpuffer versetzt und 5-10 min bei 95°C

denaturiert. Die Proben wurden in die Taschen des 5%igen Sammelgels aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 15 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel und dauerte etwa 120 min.

4x SDS-Probenpuffer:

200 mM Tris/HCl pH 7,6
4% (v/v) β -Mercaptoethanol
0,00052% (w/v) Bromphenolblau
6,4% (w/v) SDS
50% (w/v) Glycerin

10x SDS-Laufpuffer:

250 mM Tris
1% (w/v) SDS
1,92 M Glycerin

Trenngel, 15%ig: pro 6 ml:

1,5 ml H₂O
3,0 ml 40% Acrylamid-Mix
1,5 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)
60 μ l 10% SDS
40 μ l 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)
1,5 μ l TEMED

Sammelgel, 5%ig: pro 2 ml:

1,10 ml H₂O
0,34 ml 30% Acrylamid-Mix
0,50 ml 1,0 M Tris/HCl (pH 6,8)
20 μ l 10% SDS
40 μ L 10% APS
1 μ l TEMED

Verwendete Protein Größenstandards

Für die Größenbestimmung wurde der „Low Molecular Weight“ (LMW) Größenstandard von GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK) benutzt. Die im Größenstandard enthaltenen Proteine und ihr Molekulargewicht sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tab. 3.2 Zusammensetzung des LMW Größenstandards

Molekulargewicht (kDa)	Protein
97	Phosphorylase b
66	Albumin
45	Ovalbumin
30	Carboanhydrase
20,1	Trypsin-Inhibitor
14,4	α -Lactalbumin

Färben von SDS Gelen mit Coomassie

Die aufgetrennten Proteine wurden durch Coomassie-Färbung in Anlehnung an [Meyer und Lamberts 1965], durch Verwendung des Farbstoffes Coomassie Blue R 250 (Serva; Heidelberg, D), sichtbar gemacht. Die Gele wurden für mindestens 1 Stunde in Coomassie-Lösung gelegt und anschließend bis zum gewünschten Färbegrad in Entfärbelösung inkubiert. Nach dem Spülen der Gele mit H₂O konnten sie eingescannt und anschließend auf Whatman-Papier getrocknet werden.

Färbelösung:

0,2% SERVA Blue R 250

30% Ethanol

10% Essigsäure

Entfärbelösung:

30% Ethanol

10% Essigsäure

3.6 Chemische und biochemische Präparationen

3.6.1 Verwendete Elektroden

Für die zykelvoltammetrischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit kamen unterschiedliche Elektroden zum Einsatz. Elektrochemische Untersuchungen an makroskopischen Elektroden erfolgten, wenn nicht anders erwähnt, an einkristallinen Au(111) Kristallen. Diese hatten zylindrische Form und einen Durchmesser von 3-4 mm. Für zykelvoltammetrische Untersuchungen wurden sie für mindestens 30 min in konzentrierter Schwefelsäure inkubiert, um organische Verunreinigungen an der Oberfläche zu entfernen. Anschließend wurden die Kristalle gründlich mit MilliQ gespült und abschließend mit Hilfe einer Butangas- oder Wasserstoffflamme für 2-5 min zum Glühen gebracht.

In einigen Fällen kamen polykristalline planare Au Substrate als Elektroden zum Einsatz. Diese bestanden aus einem (100)-orientierten Si Substrat mit thermisch aufgedampften Schichten aus Titan (20 nm) und Gold (200 nm).

Für die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie wurden spezielle goldbeschichtete Glassubstrate der Firma Mivitec (Sinzig, D) verwendet. Diese Glasträger mit den Maßen von 20 x 20 mm und einer Dicke von 1 mm waren mit einer 15-30 nm dicken Goldschicht bedampft. Vor Benutzung wurden sie gründlich mit Ethanol und MilliQ gespült.

Au-Nanopillar Elektroden

Nanostrukturierte Elektroden bestanden aus Au Nanopillar (NP) Arrays mit Pillarhöhen von durchschnittlich 200 nm und einem Durchmesser von etwa 50 nm. Die Au Nanopillar Strukturen wurden durch galvanische Abscheidung von Gold in poröses Aluminiumoxid, nach der Methode von [Wolfrum *et al.* 2006A; Wolfrum *et al.* 2006B], hergestellt. Hierzu wurden Si(100) Substrate thermisch mit dünnen Filmen Titan (20 nm), Gold (200 nm) und Aluminium (400 - 500 nm) bedampft. Durch Anodisierung des Aluminiumfilms in 0,3 M Oxalsäure bei 40 mV bildete sich poröses Aluminiumoxid. Die am Boden der Poren verbleibende dünne Grenzschicht wurde durch einen Ätzschritt mit 5%iger Phosphorsäure entfernt und so die Nanokanäle innerhalb des porösen Aluminiumoxids mit dem darunter liegenden Au Film verbunden. In einem weiteren Schritt erfolgte die galvanische Abscheidung von Gold in die Nanoporen. Hierfür wurde Pur-A-Gold Lösung der Firma

Enthone GmbH mit $\text{K}[\text{Au}(\text{CN})_2]$ und einer finalen Gold Konzentration von 10 g/l (pH 5,75) verwendet. Die galvanische Abscheidung erfolgte bei 60° C und einer Stromdichte von 6 mA/cm² für 60-80 Sekunden. Abschließend wurde das poröse Aluminiumoxid durch Inkubation in 20%iger KOH Lösung komplett entfernt.

Crossbar-Elektroden

Untersuchungen des Ladungstransfers durch bifunktional immobilisiertes Cyt c erfolgten an Au Crossbarelektroden. Die verwendeten Crossbarstrukturen bestanden aus einer parallelen Anordnung von sich kreuzenden Leiterbahnen. Zwischen diesen Leiterbahnen erfolgte die Immobilisierung des Proteins. Bottoelektroden (BE) und Topelektroden (TE) wurden photolithographisch bei Sony Deutschland (Stuttgart) gefertigt und uns für die Untersuchungen überlassen. Die Crossbarstrukturen bestanden aus je 16 Au Leiterbahnen mit unterschiedlichen Durchmessern zwischen 10 µm und 1 µm. Die TE wurden durch einen separaten lithographischen Prozess hergestellt und mittels *Polymer Assisted Lift-Off* (PALO) in Anlehnung an [Shimizu *et al.* 2006] auf die BE gedruckt. Die BE wurde, sofern nicht anders beschrieben, mit einer für die jeweilige Immobilisierung benötigten SAM und Cyt c analog zu makroskopischen Au Elektroden beschichtet (3.6.2 und 3.6.3). TE kamen unbeschichtet oder mit einer SAM beschichtet zum Einsatz. Das Drucken der TE auf die BE erfolgte mit Hilfe eines *Fineplacers* (Finetech GmbH & Co KG; Berlin, D), um eine exakte Positionierung zu erzielen. Abbildung 3.4 zeigt eine schematische Darstellung der Crossbarstrukturen nach dem Drucken mit Leitungsbahnen unterschiedlicher Durchmesser.

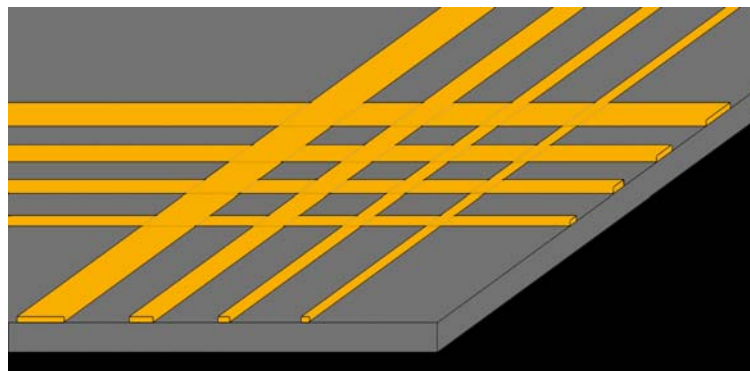


Abb. 3.4 Schematische Zeichnung einer Au Crossbarstruktur mit 4 x 4 Leiterbahnen unterschiedlicher Durchmesser zwischen 1 µm und 10 µm.

3.6.2 Beschichtung mit selbstorganisierenden Monolagen

Für die Immobilisierung von Proteinen wurden die Goldsubstrate mit einer selbstorganisierenden Monolage (SAM) beschichtet. Die aufgebrachten Moleküle bestanden aus einer zentralen Kohlenwasserstoffkette mit bis zu 16 Kohlenstoffatomen, oder einem aromatischen Ring mit endständiger funktioneller Gruppe. Zusätzlich enthielten sie immer eine endständige Thiolgruppe, oder eine interne Disulfidbindung, über die sie durch Ausbildung einer sehr stabilen Gold-Schwefel-Bindung an das Goldsubstrat binden konnten. Tabelle 3.3 zeigt eine Übersicht, der für die SAM verwendeten Moleküle. Falls nicht anders erwähnt, wurden die Au-Substrate zur Beschichtung in 10 mM ethanolischer Lösung des jeweiligen Thiols für mindestens 1 h inkubiert und anschließend mit Ethanol und MilliQ gespült.

Tab. 3.3 Verwendete Chemikalien zur Beschichtung von Au Substraten mit einer SAM

Chemikalienname	Abkürzung	Funktionelle Gruppe	Lösung in	Konzentration [mM]
Dithiobis(N-succinimidylpropionat)	DTSP	-NHS*	DMSO	2,5
2-Mercaptobenzoessäure	2-MBA	-COOH	EtOH	10
3-Mercaptobenzoessäure	3-MBA	-COOH	EtOH	10
4-Mercaptobenzoessäure	4-MBA	-COOH	EtOH	10
2-Mercaptoethanol	MEtOH	-OH	H ₂ O	10
6-Mercaptohexanol	MHOH	-OH	EtOH	10
4-Mercatophenol	MPhOH	-OH	EtOH	10
3-Mercaptopropanol	MPOH	-OH	EtOH	10
3-Mercaptopropionsäure	MPA	-COOH	EtOH	10
6-Mercaptohexansäure	MHA	-COOH	EtOH	10
11-Mercaptoundecanol	MUOH	-OH	EtOH	10
11-Mercaptoundecansäure	MUA	-COOH	EtOH	10
15-Mercaptopentadecansäure	MPDA	-COOH	EtOH	10
16-Mercaptohexadecansäure	MHDA	-COOH	EtOH	10
SPT-0012A	SPT12	-COOH	EtOH	10
Hexanthiol	HxT	-CH ₃	EtOH	10
Undecanthiol	UDT	-CH ₃	EtOH	10

* NHS = N-Hydroxysuccinimid

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten elektrochemische Untersuchungen an gemischten Monolagen, bestehend aus MUA und SPT-0012A. SPT-0012A wurde von der Firma SensoPath Technologies Inc. (Bozeman, MT, USA) synthetisiert und enthält eine endständige Carboxylgruppe, eine weitere endständige Thiolgruppe und eine Ethylenglykol-

Einheit (Abbildung 3.5). Über die Thiolgruppe kann dieses Molekül an eine Goldoberfläche gebunden werden. MUA kam als zweite Komponente zum Einsatz, um die Oberflächendichte der Ethylenglykolgruppen zu kontrollieren. Zur Beschichtung der Goldsubstrate mit einer gemischten Monolage wurden diese für 16 h in ethanolischer Lösung mit unterschiedlichen Konzentrationen der beiden Komponenten inkubiert. Es wurden folgende prozentualen Konzentrationsverhältnisse mit einer 0,1 mM Endkonzentration verwendet:

SAM SPT12/MUA = (100/0), (75/25), (50/50), (25/75) und (0/100))

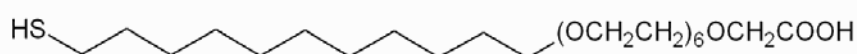


Abb. 3.5 Strukturformel von SPT-0012A der Firma SensoPath Technologies Inc. (Bozeman, MT, USA)

Für die elektrochemische Oberflächencharakterisierung der Au Nanopillar Strukturen wurden diese mit 6-(Ferrocenyl)hexanethiol (FcHxT) und 1-Hexanthiol (HxT) beschichtet. Zur Ausbildung einer homogenen gemischten Monolage aus FcHxT und HxT [Creager *et al.* 1992], wurden die Goldsubstrate ÜN in einer ethanolischen Lösung mit Konzentrationen von 1 mM FcHxT und 10 mM HxT inkubiert. Anschließend wurden die Substrate gründlich mit Ethanol und MilliQ gespült.

3.6.3 Immobilisierungsmethoden

Kovalente Immobilisierung

Für die kovalente Immobilisierung von Pferdeherz Cyt c direkt auf die Goldoberfläche, wurde das Goldsubstrat nach gründlicher Reinigung für mindestens 15 min in verdünnter Cyt c Lösung inkubiert. Die Verdünnung erfolgte in 5,78 mM Phosphatpuffer, sodass sich eine Endkonzentration von 10-20 µM Cyt c ergab.

Die kovalente Immobilisierung von Cyt c, über die an der Proteinoberfläche vorhandenen Aminogruppen, erfolgte mit Hilfe von EDC und NHS. Hierzu wurde die Goldoberfläche zunächst mit einer SAM aus MUA beschichtet (siehe oben) und anschließend für 5-10 min in 10 mM HEPES Puffer pH 7,2 mit darin gelöstem EDC (200 mM) und NHS (50mM) inkubiert. Nach gründlichem Spülen mit MilliQ, erfolgte die Inkubation in 20 µM Cyt c Lösung in 5,78 mM Phosphatpuffer.

Alternativ zur kovalenten Immobilisierung mittels EDC und NHS, ließ sich Cyt c durch Bindung an eine SAM aus 3-Thiosuccinimidylpropionat (TSP) immobilisieren. Hierzu wurde das Goldsubstrat für 15-20 min in 2,5 mM DTSP Lösung in DMSO inkubiert, anschließend gründlich mit DMSO gespült, getrocknet und für mindestens 30 min in 10-20 μ M Cyt c Lösung getaucht.

Elektrostatische Immobilisierung

Cyt c besitzt an seiner Proteinoberfläche eine Vielzahl von Lysinen, die bei neutralen bis leicht alkalischen Umgebungsbedingungen zu einer positiven Nettoladung des Proteins führen und verantwortlich für die elektrostatische Anbindung der natürlichen Reaktionspartner von Cyt c sind [Timkovich 1975; Smith *et al.* 1976; Ataka *et al.* 2004A]. Diese Polarität der Proteinhülle kann zur elektrostatischen Immobilisierung von Cyt c auf negativ geladenen Oberflächen genutzt werden (vergleiche Kapitel 2.3.1). In dieser Arbeit wurden Goldoberflächen wie unter Punkt 3.6.2 mit einer SAM beschichtet, die endständige Carboxylgruppen trug. Die Proteinimmobilisierung erfolgte durch Inkubation der SAM-modifizierten Goldsubstrate in einer 10-20 μ M Cyt c Lösung in 5,78 mM Phosphatpuffer pH 7,0 für mindestens 5 min. Nach der Inkubation wurden die Substrate mit Phosphatpuffer gespült, um nicht gebundenes Protein zu entfernen.

Tag Immobilisierung

Die Immobilisierung von Proteinen mit Hilfe von Affinitätstags findet im Bereich der Biotechnologie breite Anwendung, vor allem bei der Aufreinigung rekombinanter Proteine. Bei Affinitätstags handelt es sich im Wesentlichen um kurze Peptidsequenzen, die an das eigentlich zu immobilisierende Protein angehängt werden und die eine spezifische Affinität zu einem Substrat oder Liganden aufweisen (vergleiche Kapitel 2.3.3). Durch Kopplung dieses Bindungspartners an eine Trägersubstanz, lassen sich derart getaggte Proteine an die Trägersubstanz immobilisieren.

Ziel in dieser Arbeit war es, Cyt c auf Goldoberflächen gerichtet zu immobilisieren. Um dieses zu erreichen, wurden Affinitätstags an unterschiedlichen Positionen in die Aminosäuresequenz eingebracht (siehe Kapitel 4).

Die Immobilisierung von His₆ getaggttem Cyt c auf Goldoberflächen, erfolgte nach der von [Ataka *et al.* 2004B] beschriebenen Methode. Hierzu musste das Goldsubstrat zunächst in einem mehrstufigen Prozess mit einer SAM aus 3-Thiosuccinimidylpropionat (TSP) und

N(α),N(α)-Bis(carboxymethyl)-L-lysinhydrat (ANTA) beschichtet werden [Ataka *et al.* 2004B]. Das Goldsubstrat wurde zunächst für 15-20 min in 2,5 mM DTSP-Lösung in DMSO inkubiert. Bei der Adsorption des DTSP wird die Disulfidbrücke gespalten und beide Molekülhälften binden über eine Au-Schwefel-Bindung an die Oberfläche. Nach gründlichem Spülen mit DMSO und Trocknen unter Argon, erfolgte der zweite Inkubationsschritt in ANTA-Lösung. Das Substrat wurde 1-2 h in 0,5 M K₂CO₃-Puffer pH 9,8 mit 150 mM ANTA inkubiert. In einem letzten Schritt wurde das Goldsubstrat nach dem Spülen mit MilliQ für etwa 15 min in eine 50 mM NiSO₄ Lösung getaucht. Während dieses Schrittes binden die Nickel-Ionen an das ANTA, sodass sich der für die Histidin-Bindung erforderliche NiNTA-Komplex an der Oberfläche ausbildet.

Die Proteinimmobilisierung erfolgte während mindestens 60 min Inkubation in einer verdünnten Proteinlösung des aufgereinigten, rekombinanten Cyt c. Verdünnt wurde standardmäßig in 5,78 mM Phosphatpuffer pH 7,0. Die Endkonzentration Cyt c betrug etwa 10 μ M. Nach der Inkubation wurde die Goldoberfläche durch Spülen mit Phosphatpuffer von ungebundenem Protein gereinigt.

Rekombinantes Protein mit Cys Tag wurde auf zwei unterschiedliche Arten kovalent an die Goldoberfläche gebunden. Eine Methode sah die direkte Immobilisierung des Proteins an die blanke Goldoberfläche über die zusätzlich eingefügten Cysteine vor. Hierzu wurde das bereits beschriebene Protokoll zur kovalenten Immobilisierung benutzt (siehe oben). Um Wechselwirkungen der internen Cysteine mit dem Goldsubstrat und die Gefahr einer Denaturierung zu verhindern, und um eine homogene Orientierung des Proteins an der Goldoberfläche zu gewährleisten, wurde diese mit einer SAM eines Thioalkohols beschichtet (siehe Kapitel 3.6.2). Anschließend erfolgte die Immobilisierung des rekombinanten Proteins, wie zuvor beschrieben, durch Inkubation in verdünnter Cyt c Lösung (ca. 10 μ M) für mindestens 60 min.

Immobilisierung von Microperoxidase

Microperoxidase-11 (MP-11), ein aus 11 Aminosäuren bestehendes, mit Häm beladenes Polypeptid, lässt sich über hydrophobe Wechselwirkungen an Goldoberflächen immobilisieren. Hierzu wurde die Goldoberfläche mit einer SAM aus Thiolen beschichtet. Die Inkubation erfolgte ÜN in ethanolischer Lösung mit einer 10 mM Thiolkonzentration. Nach der Inkubation wurde mit Ethanol und MilliQ Wasser gespült. Anschließend erfolgte die

Immobilisierung der MP-11 analog zu [Ruzgas *et al.* 1999] durch Inkubation in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 mit 1 mM MP-11 für ca. 30 min.

3.7 Physikalische Analysemethoden

3.7.1 Optische Methoden

Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie

Bei der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (**S**urface **P**lasmon **R**esonance, SPR) handelt es sich um eine spektroskopische Methode zur Messung von Schichtdicken und dielektrischen Eigenschaften dünner Filme. Das Verfahren wurde erstmals von [Otto 1968] zur Bestimmung von Brechungsindizes verwendet und kurz darauf von [Kretschmann und Raether 1968] in modifizierter Konfiguration angewendet.

Bei der SPR macht man sich zunutze, dass Licht, das an einem metallischen Film total reflektiert wird, dort eine Oberflächenplasmonresonanz, d.h. eine kollektive Schwingung der Leitungsbandelektroden, anregt. Aufgrund der Oberflächenplasmonresonanz kommt es unter einem bestimmten Einfallswinkel zu einem Intensitätsminimum beim reflektierten Licht. In der Praxis wird parallel polarisiertes Licht durch ein Prisma auf die Unterseite eines dünnen, aufgedampften Metallfilms gestrahlt, wo es zur totalen inneren Reflexion kommt und wodurch auf der Oberseite des Metallfilms ein Oberflächenplasmon angeregt wird. Die Wellenlänge eines Oberflächenplasmons ist sehr stark von den Umgebungsbedingungen abhängig. So reicht bereits eine Monolage einer molekularen Substanz an der Oberfläche der Metallschicht aus, um eine detektierbare Änderung der Plasmonwellenlänge hervorzurufen. Hierdurch kommt es zu einer Verschiebung der Lage der Resonanz über den Einfallswinkel, was sich in einer Verschiebung des Intensitätsminimums äußert.

Aufgrund dieser Sensitivität ist es möglich, mittels SPR den Verlauf chemischer Oberflächenreaktionen, die zu einer Änderung der Schichtdicke führen, in Echtzeit zu verfolgen. Aufgrund seiner Eignung zur Untersuchung von biomolekularen Wechselwirkungen in Echtzeit, wird dieses Verfahren zunehmend zur Entwicklung neuer Biosensoren verwendet. Hierbei wird zunächst ein Ligand auf der Sensoroberfläche immobilisiert. Derartige Liganden sind meist Proteine oder andere Moleküle, die nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip Affinität zu einem anderen Molekül aufweisen. In einem zweiten Schritt wird eine Lösung mit dem entsprechenden Bindepartner über die Oberfläche geleitet.

Es kommt zur spezifischen Bindung an die immobilisierten Moleküle, wodurch sich die dielektrischen Eigenschaften der Sensorschicht ändern, und sich die Oberflächenplasmonresonanz verschiebt. Neben einer qualitativen Untersuchung des Bindeverhaltens, ermöglicht die SPR auch die quantitative Ermittlung von Analytkonzentration, sowie Bindungs- und Dissoziationskonstanten. Abbildung 3.6 zeigt schematisch das Detektionsprinzip von biomolekularen Wechselwirkungen mittels SPR.

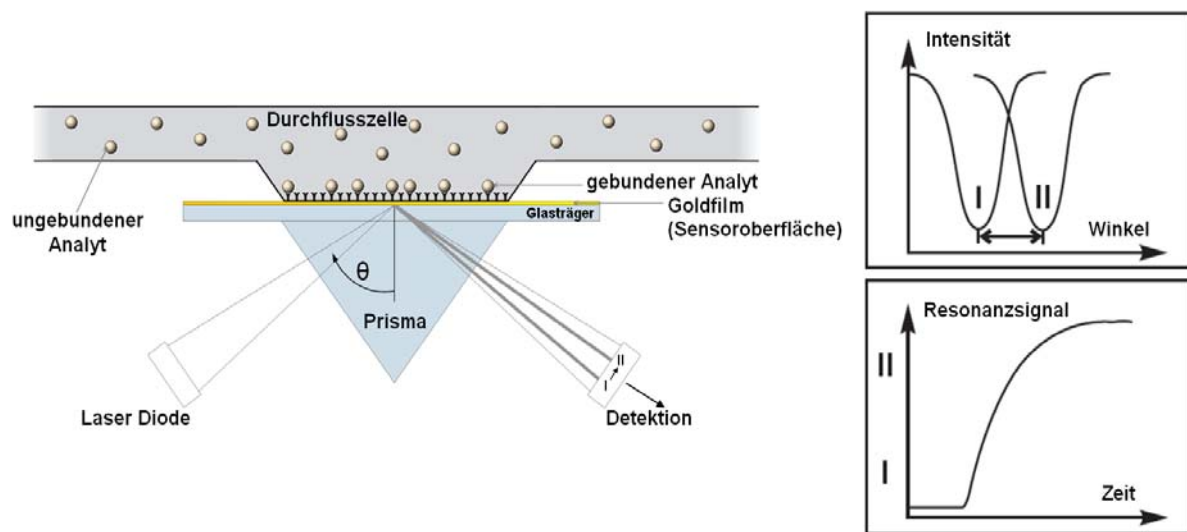


Abb. 3.6 Schematische Darstellung des Detektionsprinzips biomolekularer Wechselwirkungen mit Hilfe eines Kretschmann SPR-Spektrometers nach [Bücker 2007].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SPR-Spektroskopie zur qualitativen Untersuchung des Immobilisierungsverhaltens von Cyt c auf unterschiedlich funktionalisierten Goldsubstraten verwendet. Die Untersuchungen erfolgten mit einem Spektrometer des Kretschmann Typs (Biosuplar 3 SPR Reflectometer der Firma Analytical μ -Systems / Mivitec GmbH). Als Lichtquelle diente eine Laserdiode mit niedriger Verlustleistung ($\lambda = 670 \text{ nm}$). Für die Messungen kamen spezielle, goldbedampfte Glasträger (Brechungsindex 1,61) zum Einsatz. Nach dem Reinigen wurden die Goldproben, falls erforderlich, mit einer SAM beschichtet und nach gründlichem Spülen auf das Prisma aufgelegt. Zur optischen Kopplung wurde zwischen Glasprisma und Glasträger ein Tropfen Immersionsöl (Brechungsindex 1,61) aufgetragen. Auf die goldbeschichtete Oberseite wurde eine Durchflusszelle mit einem Volumen von etwa $20 \mu\text{l}$ aufgesetzt, die vor jeder Messung mit Standardphosphatpuffer gespült wurde. Der Start der Messung erfolgte erst nach Erreichen einer konstanten Temperatur und damit verbunden eines stabilisierten Signals. Vor Zugabe von Cyt c erfolgte die Aufzeichnung der Resonanzkurve in Phosphatpuffer. Im Anschluss daran wurde in Phosphatpuffer gelöstes

Cyt c in die Messzelle gepumpt (Flussrate 0,256 ml/min; REGLO Digital, ISMATEC) und die zeitliche Änderung der Reflektivität ΔR unter konstantem Einfallswinkel aufgezeichnet. Nach Erreichen eines konstanten Wertes, wurde die Pumpe gestoppt und anschließend für einige Minuten mit Phosphatpuffer gespült, bis erneut ein konstanter Wert erreicht war.

Zur Untersuchung der bifunktionalen Immobilisierung von Cyt c, wurde nach der Immobilisierung von Cyt c und anschließendem Spülen mit Puffer, in einem weiteren Schritt, eine Gold Nanopartikel Lösung durch die Zelle geleitet. Hierfür kam Gold Nanopartikel Lösung der Firma Sigma mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 5 nm zum Einsatz, die zuvor 1:1 mit Standardphosphatpuffer gemischt wurde. Nach Erreichen eines stabilen Wertes wurde nochmals mit Puffer gespült. Nach jeder Messung erfolgte die Aufzeichnung der Resonanzkurve zu Vergleichszwecken.

UV/VIS Spektroskopie

Unter UV/VIS Spektroskopie versteht man eine spektroskopische Untersuchungsmethode, bei der elektromagnetische Wellen des ultravioletten und des sichtbaren Lichts genutzt werden. Aufgrund ihrer charakteristischen Licht-Absorption, lassen sich Chromoproteine wie Cyt c mit Hilfe der UV/VIS Spektroskopie charakterisieren [Will *et al.* 1983]. Zur Prüfung der Funktionalität von rekombinant hergestelltem Cyt c, wurden UV/VIS Messungen durchgeführt. Das UV/VIS Absorptionsspektrum von rekombinantem Cyt c ließ sich mit kommerziell erhältlichem vergleichen und mittels einer Kalibration (Proteinkonzentration zwischen 2 μM und 20 μM) die Konzentrationen an funktionalem, rekombinantem Protein bestimmen. Gemessen wurde im Wellenlängenbereich 300-600 nm mit dem Lambda 900 UV/VIS Photospektrometer der Firma Perkin Elmer.

Die Untersuchung der chemischen Oxidation und Reduktion von Cyt c erfolgte ebenfalls mittels UV/VIS Spektroskopie. Zur Reduktion von Cyt c, wurde der Proteinlösung Natriumdithionit im Überschuss zugegeben und anschließend das UV/VIS Spektrum aufgezeichnet. Da Natriumdithionit sein Absorptionsmaximum im Wellenlängenbereich zwischen 300 und 400 nm hat, wurde hier nur das Spektrum zwischen 380 und 600 nm aufgezeichnet. Die chemische Oxidation von Cyt c erfolgte durch Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat(III). Der Cyt c Lösung wurden solange Salzkristalle zugegeben, bis sich die Lösung schwach gelb verfärbte. Das Absorptionsmaximum von gelöstem Kaliumhexacyanoferrat(III) liegt zwischen 400 nm und 500 nm, sodass in diesem Falle die Aufzeichnung des UV/VIS Spektrums zwischen 500 nm und 600 nm erfolgte.

Die natürliche Funktionalität des in Puffer gelösten rekombinanten Cyt *c* wurde mit Hilfe eines photochemischen Enzymtests überprüft. In seiner natürlichen Umgebung wird oxidiertes Cyt *c* von der Cytochrom *c* Reduktase enzymatisch reduziert. Die Firma Sigma stellt im Internet ein Protokoll zur Überprüfung der Aktivität von Cytochrom *c* Reduktase bereit [Sigma 2002; Mahler 1955]. Mit Hilfe von kommerziellem Cyt *c* in oxidierte Form und β -NADH, reduziert das Enzym Cyt *c*. Die Änderung der Absorption von Cyt *c* aufgrund seiner Reduktion lässt sich quantitativ erfassen und daraus die Aktivität der Reduktase berechnen. In Anlehnung an dieses Protokoll wurde hier der photochemische Enzymtest in modifizierter Form verwendet, um zu prüfen, ob sich rekombinantes Cyt *c* mit Hilfe kommerzieller Cyt *c* Reduktase der Firma Sigma reduzieren ließ. Es wurde zunächst das UV/VIS Spektrum von oxidiertem Cyt *c* aufgezeichnet. Zu dem in 1,2 ml Standardpuffer gelösten Cyt *c* (ca. 10 mM), wurden 100 μ l 300 mM Glycyl-Glycin-Puffer pH 8,5 und 100-200 μ l 7,05 mM β -NADH, gelöst in Glycyl-Glycin-Puffer, zugegeben. Rekombinantes Cyt *c*, das nach der Aufreinigung in reduzierter bzw. nicht vollständig oxidierte Form vorlag, wurde durch Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat(III) oxidiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 μ l Cyt *c* Reduktase Lösung, die ≥ 1 U/ml Enzym in 20 mM Kaliumhydrogencarbonat-Puffer pH 8,5 enthielt. Nach der Zugabe des Enzyms, wurde das UV/VIS-Spektrum im Wellenlängenbereich 500-600 nm nach 1 min, 3 min, 5 min und in einigen Fällen 7 min Inkubationszeit aufgezeichnet.

3.7.2 Zykelvoltammetrie

Die Zykelvoltammetrie ist eine elektrochemische Analysemethode, die zur Aufklärung der Thermodynamik von Redoxprozessen an Elektroden und zur Untersuchung der Kinetik von heterogenen Elektronentransferreaktionen Anwendung findet [Laviron 1979]. Hierbei wird der Stromverlauf in Abhängigkeit der angelegten Spannung aufgezeichnet. Das angelegte Potential wird variiert, indem es zyklisch, zunächst linear, bis zu einem positiven Umkehrpotential erhöht wird. Um den Potentialzyklus zu vervollständigen, wird der Potentialvorschub umgekehrt und das Potential bis zum Erreichen des negativen Umkehrpotentials bzw. des Startpotentials linear abgesenkt (Abbildung 3.7). Aufgrund dieses dreiecksförmigen Spannungsverlaufes wird diese Methode oft auch als Dreiecksspannungsmethode bezeichnet.

Bei dieser Untersuchungsmethode können grundsätzlich zwei Arten von Elektrodenprozessen beobachtet werden. Bei der Ersten kommt es während der Potentialverschiebung

zum Ladungstransfer über die Phasengrenze Metall/Elektrolyt (Helmholtz-Schicht). Hierbei handelt es sich in der Regel um Elektronenübergänge, wodurch es zur Oxidation bzw. Reduktion an der Elektrodenoberfläche kommt. Da diese Prozesse den Gesetzmäßigkeiten des Faraday-Gesetzes unterliegen, bezeichnet man sie als Faradayprozesse. Demgegenüber gibt es die Nicht-Faradayprozesse an der Elektrode, die überwiegend auf Ladeprozessen an der Grenzfläche zwischen Elektrode und Elektrolyt beruhen. Dabei kommt es zu keinem Ladungstransfer über die Grenzfläche, sondern aufgrund der Potentialdifferenz zwischen Elektrode und Elektrolyt zu einer lokalen Änderung der Elektrolytzusammensetzung. Obwohl es zu keinem Ladungsübertritt kommt, kann dennoch kurzzeitig ein externer Ladestrom fließen, wenn sich Potential, Elektrodenoberfläche oder Lösungsmittelzusammensetzung ändert. Im Gegensatz zu den Faradayprozessen, spielen Effekte von Nicht-Faradayprozessen in dieser Arbeit eine untergeordnete Rolle. Sie dürfen aber bei der Betrachtung elektrochemischer Daten zur Bestimmung des Ladungstransfers nicht außer Acht gelassen werden.

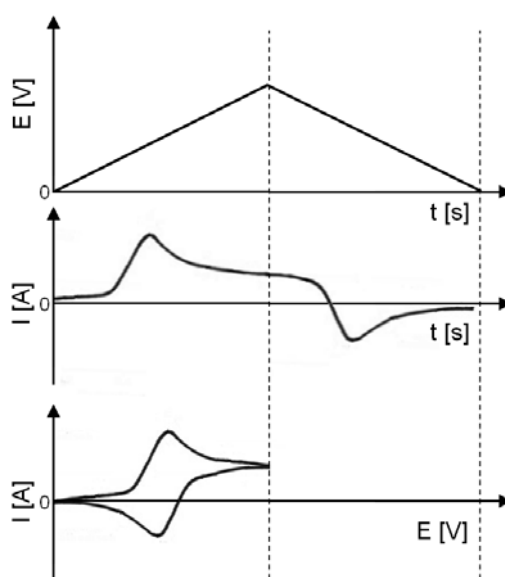


Abb. 3.7 Typischer Verlauf eines Zykelvoltammogramms in unterschiedlicher Darstellung bei angelegter Dreiecksspannung nach [Salomon 2005].

Zyklovoltammetrische Messungen im Elektrolyten erfolgen in der Regel in einer Dreielektrodenanordnung, bestehend aus Arbeits-, Gegen- und einer nicht polarisierten Referenzelektrode. Die Stromänderung wird zwischen Arbeits- und Gegenelektrode detektiert, die Spannungsmessung erfolgt hingegen zwischen Arbeits- und Referenzelektrode. Dabei kann der ohmsche Spannungsabfall zwischen Arbeits- und

Gegenelektrode vernachlässigt werden, da zwischen Arbeits- und Referenzelektrode praktisch kein Strom fließt. Abbildung 3.7 zeigt den typischen Verlauf eines Zykovoltammogramms, bei dem der Massentransport der elektroaktiven Spezies ausschließlich durch Diffusion erfolgt. Dabei ist zunächst ein Anstieg des Stromes zu beobachten, der kurz darauf wieder abfällt und zu einem charakteristischen Peak führt. Verantwortlich für diesen Verlauf sind zwei Vorgänge. Die Erhöhung des angelegten Elektrodenpotentials führt an der Phasengrenze zu einem Überpotential, das einen unmittelbaren Stromanstieg zur Folge hat. Gleichzeitig kommt es aber mit der Wurzel der Zeit $t^{1/2}$ zu einer Verbreiterung der Diffusionsgrenzschicht, was dem Stromanstieg entgegen wirkt. Ab dem Zeitpunkt, an dem die Konzentration der Redoxspezies an der Elektrode den Wert Null erreicht, sinkt der Stromfluss mit $t^{1/2}$, bis das Umkehrpotential erreicht ist.

Ein etwas anderer Kurvenverlauf ergibt sich bei zykovoltammetrischen Messungen an Systemen, bei denen die redoxaktive Spezies fest an der Elektrodenoberfläche gebunden ist (Abbildung 3.8). In diesem Fall beruht die Abnahme des Stromes nicht in einer Begrenzung durch Diffusion, sondern erfolgt durch die vollständige Oxidation bzw. Reduktion, der an der Oberfläche gebundenen Redoxspezies.

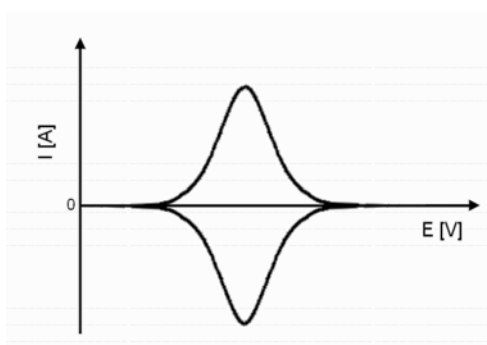


Abb. 3.8 Verlauf eines Zykovoltammogramms bei einer fest an der Elektrodenoberfläche gebundenen Redoxspezies nach [Salomon 2005].

Zykovoltammetrische Untersuchungen in dieser Arbeit wurden mit einem EG&G Potentiostaten Modell 283 der Firma Princeton Applied Research bzw. einem Autolab Potentiostaten PGSTAT 302 der Firma Eco Chemie durchgeführt. Für die zykovoltammetrischen Untersuchungen kamen zwei unterschiedliche Elektrochemiezellen zum Einsatz. Standardmäßig erfolgten die Untersuchungen an Au(111) Einkristall Elektroden in einer Elektrochemie-Zelle aus Glas (Abbildung 3.9). Der Kristall wurde in Hängender-Meniskus-Konfiguration von oben in die Elektrolytlösung getaucht. Aufgrund der Oberflächenspannung des Elektrolyten, bildete sich hierbei ein Meniskus zwischen Elektrode

und Elektrolytoberfläche aus. Hierdurch wurde gewährleistet, dass nur die Unterseite des Einkristalls Kontakt mit dem Elektrolyten hatte, und somit von einer definierten Elektrodenoberfläche ausgegangen werden konnte. In zwei seitlichen Armen der Zelle, die mit der Hauptkammer verbunden waren, wurden eine Platin-Elektrode als Gegen- und eine Calomel-Elektrode als Referenzelektrode eingesetzt. Vor jeder Messung erfolgte das Spülen der Elektrolytlösung über einen speziellen Anschluss für mindestens 20 min mit Argon, wobei der Gasstrom durch die Lösung geleitet wurde. Während der Messungen wurde der Gasstrom umgeleitet, sodass der Raum über dem Elektrolyten mit Argon überschichtet war.

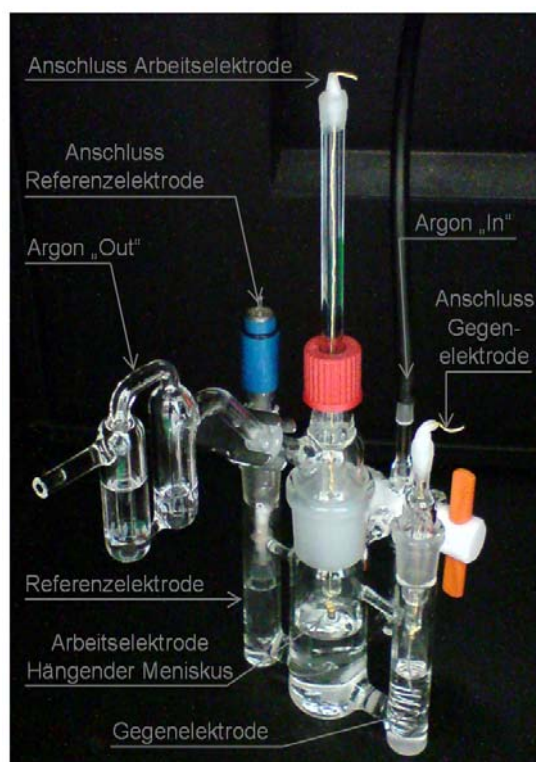


Abb. 3.9 Elektrochemiezelle aus Glas, bestehend aus einer Hauptkammer, die über den Elektrolyten mit zwei seitlichen Armen verbunden ist. In den seitlichen Armen platziert sind Referenz- und Gegenelektrode. Die Arbeitselektrode befindet sich in Hängender-Meniskus-Konfiguration in der Hauptkammer. Seitliche Anschlüsse ermöglichen das Spülen von Elektrolyt bzw. Zelle mit Argon.

Elektrochemische Untersuchungen an planaren Substraten erfolgten in einer speziell für diesen Zweck entwickelten Teflon-Zelle (Abbildung 3.10 a-d). Hierbei wurde die Kammer mit dem Elektrolyten auf dem planaren Substrat bzw. der Arbeitselektrode platziert und mit Hilfe eines O-Ringes abgedichtet. Über den O-Ring Durchmesser wurde die Elektrodenoberfläche definiert, die Kontakt zum Elektrolyten hat. Die Kontaktierung der Elektrode erfolgte von oben über einen Federkontakt. Als Gegenelektrode diente ein Platindraht, als Referenzelektrode

wurde eine Ag/AgCl₂-Elektrode (äquibriert in 3 M KCl Lösung) verwendet. Die Teflonzelle verfügte ebenfalls über Anschlüsse, die ein Spülen mit Argon zuließen.

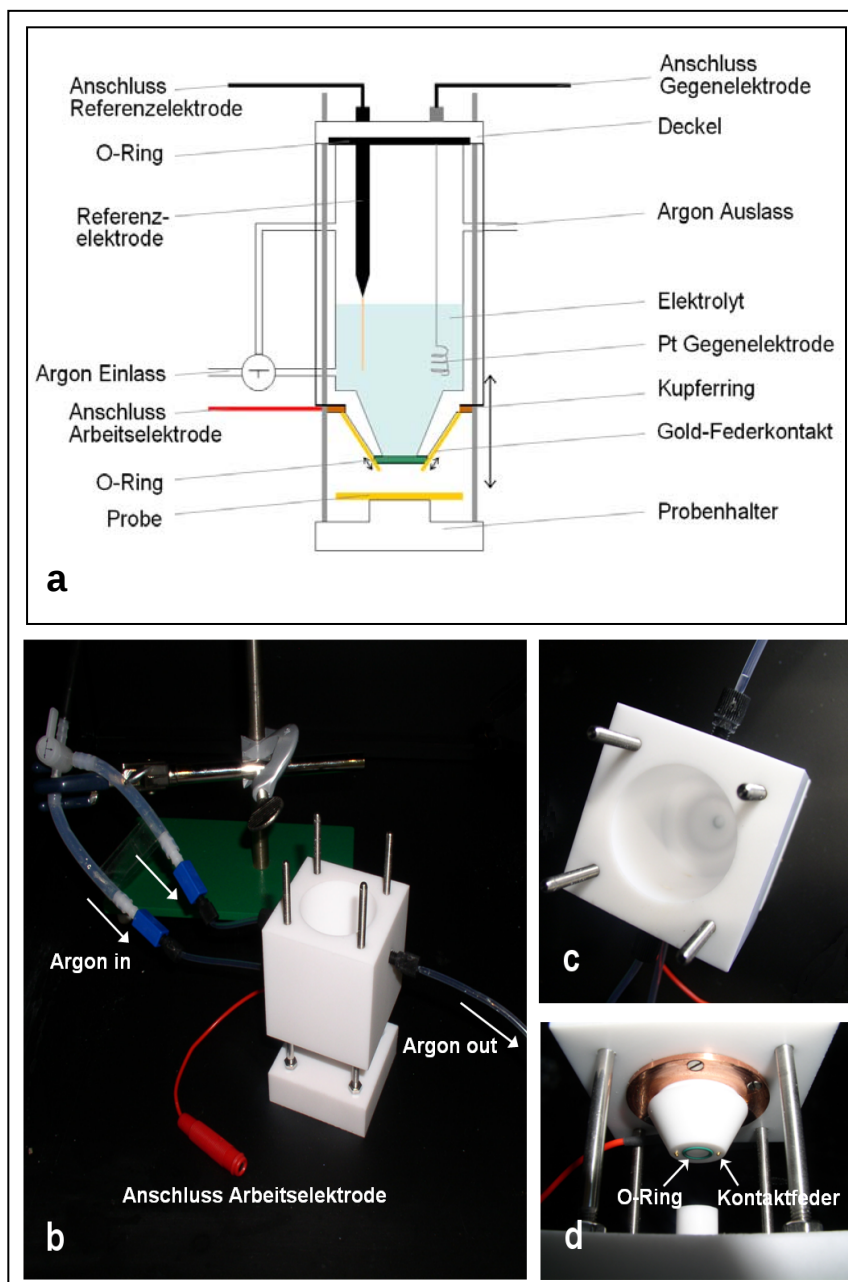


Abb. 3.10 Für Untersuchungen an planaren, metallbeschichteten Substraten entwickelte Elektrochemiezelle. a.) Schemazeichnung im seitlichen Querschnitt; b.) Gesamtansicht mit Anschlüssen für Argon und Arbeitselektrode; c.) Aufsicht; d.) Ansicht von schräg unten mit Blick auf O-Ring und Federkontakte.

Es erfolgten unterschiedliche elektrochemische Messungen. Zur Untersuchung des Redoxverhaltens immobilisierter Proteine wurde, falls nicht anders erwähnt, 5,78 mM

Natriumphosphatpuffer pH 7,0 als Elektrolyt benutzt (Standardpuffer) und in den meisten Fällen ein Potentialbereich zwischen -0,4 und +0,4 V gewählt. Die Oxidation- bzw. Reduktion der Au Elektrodenoberfläche wurde zwischen -0,4 und +1,5 V in 0,1 M H₂SO₄ durchgeführt. Untersuchungen zum Desorptionsverhalten gemischter Monolagen erfolgten in 0,5 M KOH Lösung, diffusionsabhängige CV Messungen in 1 mM K₄[Fe(CN)₆] mit 1 M KCl als Grundelektrolyt. Die Messungen erfolgten bei unterschiedlichen Potentialvorschubgeschwindigkeiten, wobei die kleinste verwendete Scangeschwindigkeit bei 2 mV/s, die größte bei 10 V/s lag.

3.7.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Oberflächencharakterisierung der Au Nanopillar Strukturen erfolgte mit Hilfe eines GEMINI 1550 Rasterelektronenmikroskops (REM). Die Proben wurden in Aufsicht und unter einem Winkel von 60° betrachtet. Aus den Aufnahmen wurden Nanopillar Höhe, Durchmesser und Abstand geometrisch bestimmt.

3.7.4 Rasterkraftmikroskopie

Mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy, AFM) lassen sich Oberflächentopografien im Subnanometerbereich auflösen [Binnig *et al.* 1986]. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der mechanischen Abtastung von Oberflächen durch Spitzen mit einem Krümmungsradius zwischen 10 nm und 30 nm und der Messung dabei auftretender interatomarer Wechselwirkungen. Eine freischwebende Blattfeder, die mit einer sehr feinen Spitze aus Si₃N₄ oder Si bestückt ist, der sogenannte Cantilever, wird durch die Schwingung eines Piezokristalls in einem definierten Raster über die zu untersuchende Oberfläche bewegt. Im „tapping Mode“ (TM-AFM) wird über einen zweiten Piezo der Cantilever zum resonanten Schwingen in z-Richtung angeregt. Die Dämpfung der Schwingungsamplitude durch Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe kann als Messinformation genutzt werden. Die minimalen Auslenkungen der Blattfeder werden durch die sich ändernde Reflektion eines auf den Cantilever gerichteten Laserstrahls detektiert.

Alle in dieser Arbeit durchgeführten AFM Messungen wurden bei Raumtemperatur mit einem MultiMode AFM / STM (Veeco / Digital Instruments; Santa Barbara, CA, USA) im „tapping mode“ mit Si-Cantilevern durchgeführt.

3.7.5 Elektrische Charakterisierung von Tunnelströmen an Crossbars

Die elektrische Charakterisierung von Crossbarelektroden erfolgte überwiegend bei Sony Deutschland (Stuttgart). Dabei wurden die Crossbar Proben in einen Träger eingesetzt und kontaktiert. Die Untersuchung der einzelnen Leiterbahnen erfolgte mit einem automatisierten Setup, bei dem nacheinander alle Kombinationen aus Bottom- und Topelektroden durch einen Vor- und Rückscan zwischen -500 mV und 500 mV auf Stromfluss geprüft wurden. Alternativ erfolgten Untersuchungen einzelner Crossbar Proben mit einer PM5 Probestation (SUSS Microtec; Garching, D) und einem 4200 Semiconductor Analyzer mit Vorverstärker von Keithley Instruments (Cleveland, OH, USA). Einzelne Leiterbahnen wurden mit Wolfram Spitzen von SUSS Microtec kontaktiert.

4. Herstellung genetisch modifizierter Cytochrom c Konstrukte

Für bioelektronische Anwendungen sollte Cyt c bifunktional an unterschiedliche Elektrodenoberflächen immobilisiert werden. Dabei muss die Orientierung des Proteins so erhalten bleiben, dass ein möglichst effizienter Elektronentransfer zwischen Elektrode und Protein gewährleistet ist. Für die elektrostatische Immobilisierung von Cyt c konnte bereits ein effizienter Elektronentransfer nachgewiesen werden [Tarlov und Bowden 1991; Salomon 2005; Imabayashi *et al.* 2005]. Dieses und weitere Immobilisierungsverfahren wurden auf ihre Eignung zur Immobilisierung von Cyt c hin untersucht (siehe Kapitel 5.1). Als alternative Immobilisierungsstrategie sollte im Rahmen dieser Arbeit die Immobilisierung mit Hilfe von Affinitätstags durchgeführt werden, die sich aufgrund ihrer hohen Spezifität und effizienten Bindungseigenschaften sehr gut für Proteinimmobilisierungen eignen [Rusmini *et al.* 2007; Paborsky *et al.* 1995; Hochuli *et al.* 1987]. Es steht eine Vielzahl von Affinitätstags zu Immobilisierungszwecken zur Verfügung (siehe Kapitel 2.3.3). Die Verwendung von Affinitätstags erfordert eine genetische Modifikation des Zielproteins. Mittels molekularbiologischer Methoden können spezifische, für den entsprechenden Tag kodierende DNA-Sequenzen in das Cyt c Gen eingefügt werden.

Für bioelektronische Anwendungen, bei denen es zu einem Elektronentransfer zwischen immobilisiertem Redoxprotein und Elektrode kommen soll, kann nicht jede Art von Affinitätstag genutzt werden. Bei der Auswahl eines Tags ist darauf zu achten, dass ein Elektronentransfer durch die Länge und Aminosäurezusammensetzung des Tags beeinflusst werden kann. Große Moleküle, wie etwa Fusionsproteine oder Avidin bzw. Streptavidin, kommen daher nicht in Betracht. Von Vorteil sind dagegen kurze Sequenzen mit freien π -Orbitalen, wie sie etwa in aromatischen Aminosäuren vorkommen. In dieser Arbeit sollten verschiedene Tag-Sequenzen, mit Hilfe molekularbiologischer Methoden, an geeigneten Stellen des Cyt c Gens eingefügt werden. Anschließend sollten die rekombinanten Proteine exprimiert, aufgereinigt und auf ihre Funktionalität hin untersucht werden.

4.1 Auswahl der Immobilisierungs Tags

4.1.1 Histidin Tag

Die Bedeutung des Histidin Tags (His Tag) für die Immobilisierung von Proteinen auf Oberflächen wurde in Kapitel 2 beschrieben. Der His Tag hat sich zu einem Standardsystem für die Immobilisierung und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen entwickelt [Porath *et al.* 1975; Schmid *et al.* 1997; Nieba *et al.* 1997; Johnson und Martin 2005]. In den letzten Jahren kamen Anwendungen im Bereich der Elektrochemie und Biosensorik hinzu [Rusmini *et al.* 2007]. So wurde rekombinante Cytochrom c Oxidase über einen His Tag an eine Goldelektrode gebunden und unter anderem der Elektronentransfer zwischen immobilisierter Oxidase und Cyt c elektrochemisch untersucht [Ataka *et al.* 2004B]. [Johnson und Martin 2005] untersuchten die Bindung von verschiedenen His getaggten Proteinen, darunter auch Cytochrom *P450c17*, auf Goldelektroden, die entweder mit NiNTA oder einem abgewandelten Affinitätsliganden beschichtet waren. Die auf diese Weise immobilisierten Proteine wurden anschließend elektrochemisch untersucht. [Balland *et al.* 2008] beschrieben die orientierte Immobilisierung von His getaggtter rekombinanter Laccase auf modifizierten Goldelektroden und zeigten, dass das Enzym funktionell aktiv war. Die unterschiedlichen Anwendungsbeispiele zeigen, dass sich der His Tag sehr gut zur funktionellen Immobilisierung von Proteinen an Elektroden und für elektrochemische Untersuchungen eignet. Entsprechend erschien der His Tag auch für die bifunktionale Immobilisierung von Cyt c geeignet. Die Aminosäure Histidin trägt eine aromatische Seitengruppe. Aromatische Moleküle weisen in der Regel gute Elektronentransfereigenschaften auf. Es gibt Untersuchungen die zeigten, dass der Elektronentransfer durch Proteine entlang bestimmter Elektronentransferpfade erfolgt, die im Wesentlichen aus Aminosäuren mit aromatischen Seitengruppen bestehen [Willner und Katz 2005]. Des Weiteren ist NiNTA als Bindedomäne für den His Tag kein allzu langes Molekül, und Ni^{2+} könnte den Elektronentransfer ebenfalls begünstigen. Um eine effiziente Immobilisierung von Cyt c mit Hilfe dieser Technik zu erreichen, sollten His₆ Tags N- und C-terminal an die Aminosäuresequenz von Cyt c angefügt werden.

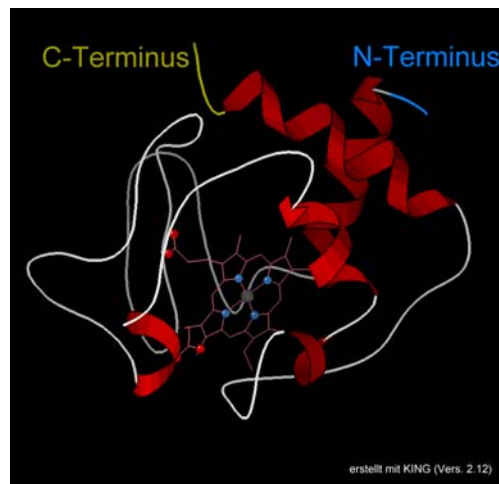


Abb. 4.1 3D Struktur von Pferdeherz Cytochrom c nach [Banci *et al.* 1999]. Farblich hervorgehoben sind N-Terminus (blau) und C-Terminus (gelb).

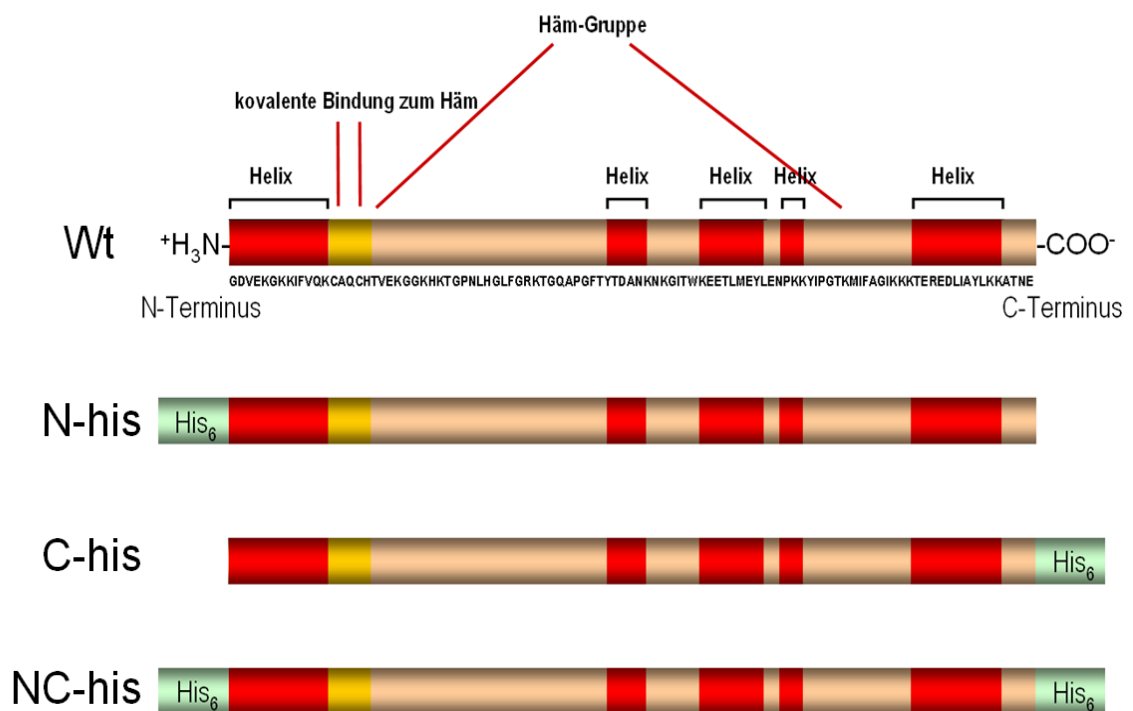


Abb. 4.2 Schematische Darstellung von Pferdeherz Cytochrom c (Wt). Die Aminosäuresequenz ist im Einbuchstabencode angegeben. Helikale Sequenzabschnitte (rot) und Verknüpfungspunkte zur Häm-Gruppe sind eingetragen. Die rekombinanten Cyt c Varianten mit den im Text beschriebenen Positionen der His₆ Tags (grün) sind ebenfalls dargestellt.

In der Aminosäurekette des Cyt c sind beide Termini frei zugänglich (Abbildung 4.1), sodass die Modifikation der Enden mit einem His Tag die Proteinstruktur kaum beeinflussen sollte.

Abbildung 4.2 zeigt eine Übersicht über die in dieser Arbeit durchgeführten Modifikationen. Ausgehend vom Wildtyp (Wt), sollten drei rekombinante Proteine mit His Tags hergestellt werden. Die erste Variante sollte einen His₆ Tag am N-Terminus tragen (N-his), die zweite Variante einen am C-Terminus (C-his). Als dritte Variante war ein Protein mit His₆ Tags am N- und C-Terminus geplant (NC-his). Es muss darauf hingewiesen werden, dass trotz der Bezeichnung N-terminaler His Tag, die N-ständige Aminosäure in diesem Fall ein Methionin ist, auf das dann erst die sechs Histidine folgen. Der Grund hierfür ist, dass die Translation während der Proteinbiosynthese stets mit einem N-terminalen Methionin beginnt.

4.1.2 Cystein Tag

Eine alternative Möglichkeit Proteine zu immobilisieren, beruht auf der hohen Bindungsstärke zwischen Schwefel und Gold [Nuzzo *et al.* 1990]. Die Bindung des Proteins erfolgt über die Thiolgruppe von Cystein-Resten an Goldoberflächen. In der Aminosäurekette von Pferdeherz Cyt c sind zwei Cysteine vorhanden, Cys14 und Cys17 [Bushnell *et al.* 1990], über die sich das Protein auf Goldoberflächen immobilisieren lassen könnte. Elektrochemische Untersuchungen mit Cyt c, das auf diese Weise kovalent auf einer Elektrodenoberfläche immobilisiert wurde, zeigten jedoch keine Redoxantworten (siehe Kapitel 5.1.2). Diese Beobachtung ist darauf zurückzuführen, dass beide Cysteine in Cyt c an die Häm-Gruppe gebunden sind. Binden die Cysteine an die Goldoberfläche, kommt es zu einer Umorientierung oder sogar Freisetzung der Häm-Gruppe und folglich zum Verlust der Redoxaktivität des Cyt c. Im Gegensatz zu Pferdeherz Cyt c, besitzt Cyt c aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ein drittes, ungebundenes Cystein (Cys102) innerhalb der Aminosäuresequenz [Bushnell *et al.* 1990]. Untersuchungen mit dem Hefe Cyt c (YCC) ergaben, dass Cys102 für eine spezifische Bindung an Goldoberflächen genutzt werden kann [Hansen *et al.* 2003], wobei es zu einer einheitlichen Orientierung des Proteins an der Oberfläche kommt [Stayton *et al.* 1992; Gerunda *et al.* 2004]. Elektrochemische Untersuchungen von [Heering *et al.* 2004] und [Bortolotti *et al.* 2006] zeigten, dass die native Elektronentransfer-Funktionalität von YCC erhalten bleibt. Neben einem stabilen und schnellen Elektronentransfer zwischen Elektrode und YCC konnte auch gezeigt werden, dass es zu einem effizienten Elektronenaustausch mit den natürlichen Reaktionspartnern von YCC wie etwa Cytochrom c Peroxidase, *cd*₁ Nitritreduktase, sowie NO-Reduktase

kommt [Heering *et al.* 2004]. In YCC befindet sich Cys102 in unmittelbarer Nähe des C-terminalen Endes. Der C-Terminus liegt gegenüber der frei liegenden Ecke der Häm-Gruppe [Louie und Brayer 1990] und der Lysin-reichen Region, über die die elektrostatische Immobilisierung von Cyt c erfolgen kann. Da es aufgrund der Lysine zur Interaktion mit den natürlichen Redoxpartnern wie *bc₁* Komplex (Cyt c Reduktase) [Hunte *et al.* 2002] und Cyt c Oxidase [Döpner *et al.* 1999; Roberts und Pique 1999] kommt, ist zu vermuten, dass bei einer Bindung über den C-Terminus die Lysin-reiche Region frei zugänglich bleibt. Für eine bifunktionale Immobilisierung von Pferde Cyt c, bietet sich als Ergänzung zur elektrostatischen Immobilisierungsmethode ein C-terminal gelegener Cystein Tag (Cys Tag) an. Um sterische Behinderungen durch das Protein und mögliche Deformationen der Proteinstruktur bei der Immobilisierung zu verhindern, entwickelten [Shi *et al.* 2004] für das Enzym Glucoseoxidase einen über eine Linker-Peptidsequenz mit dem C-terminalen Ende des Proteins verbundenen Cys Tag und zeigten, dass sich mit diesem Tag eine kontrollierte Orientierung des rekombinanten Proteins auf Au Oberflächen erzielen ließ. Für bioelektronische Anwendungen ist zu beachten, dass die Linkersequenz aus nicht zu vielen Aminosäuren besteht, da ansonsten kein Elektronentransfer zwischen Elektrode und Protein stattfinden kann. Eine hohe Bindungseffizienz lässt sich durch Verwendung mehrerer Cysteine erreichen [Ichihara *et al.* 2006; Lee *et al.* 2007]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein Cys₂ Tag eingefügt (Abbildung 4.3).

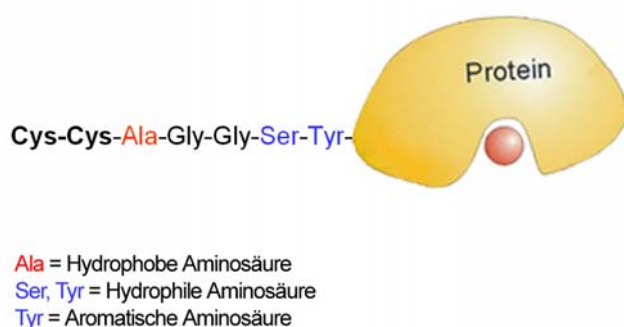


Abb. 4.3 Vereinfachte Darstellung des C-terminal an Cyt c angefügten Cys Tags. Er besteht aus zwei terminalen Cysteinen, der hydrophoben Aminosäure Alanin, zwei Glycinen, sowie den hydrophilen Aminosäuren Serin und Tyrosin. Tyrosin enthält zudem eine aromatische Seitengruppe.

Eine Passivierung der Goldoberfläche mit einer Monolage aus Thioalkoholen sollte bewirken, dass nur der eingefügte Cys Tag an die Goldelektrode bindet und nicht die internen Cysteine des Cyt c. Um die Immobilisierung von Cyt c auf der protektierten Goldoberfläche zu ermöglichen, muss der Energiegewinn bei der Bindung des Tags größer sein, als der des

jeweiligen Thioalkohols. Dieses kann durch zwei aufeinander folgende Cysteine im Cys Tag erreicht werden. Hierdurch sollte sich das chemische Gleichgewicht zugunsten der Cys-Au Bindung verschieben. Thioalkohole bestehen aus einer hydrophoben Alkylkette und einer hydrophilen OH-Kopfgruppe. Die Länge und Sequenz des Linkerpeptids wurde so gewählt, dass eine Immobilisierung des rekombinanten Cyt c zwischen den Thioalkoholen erfolgen konnte (Abbildung 4.3). Hierzu wurde neben die Cysteine Alanin, eine hydrophobe Aminosäure eingefügt, die eine Bindung an die Goldoberfläche zwischen den hydrophoben Regionen der Thioalkohole gewährleisten sollte. Angrenzend wurden analog zu [Hu *et al.* 2005] zwei aufeinanderfolgende Glycine (Gly) als *Spacer* eingesetzt. Da die OH-Kopfgruppe der Thioalkohole und die nach außen weisenden Bereiche von Cyt c hydrophil sind, wurden im Übergangsbereich zur ursprünglichen Aminosäuresequenz von Cyt c zwei hydrophile Aminosäuren platziert.

Neben einem Konstrukt, mit C-terminalem Cys Tag, wäre auch ein N-terminaler Cys Tag denkbar gewesen. Da die Proteinbiosynthese jedoch am N-Terminus beginnt, bestand die Gefahr, dass es zu Fehlfaltungen aufgrund von Wechselwirkungen mit den internen Cysteinen kommt. Hierdurch wäre die Proteinstruktur und die Anbindung der Häm-Gruppe verändert worden. Außerdem ist die Positionierung eines endständigen Cysteins am N-Terminus nicht möglich, da wie bereits erklärt die N-ständige Aminosäure stets ein Methionin ist. Aus diesen Gründen wurde auf die Herstellung eines N-terminalen Cys Tags verzichtet. Stattdessen sollte ein Konstrukt mit N-terminalem His Tag in Kombination mit C-terminalem Cys Tag hergestellt werden. Abbildung 4.4 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Konstrukte mit Cys Tag.

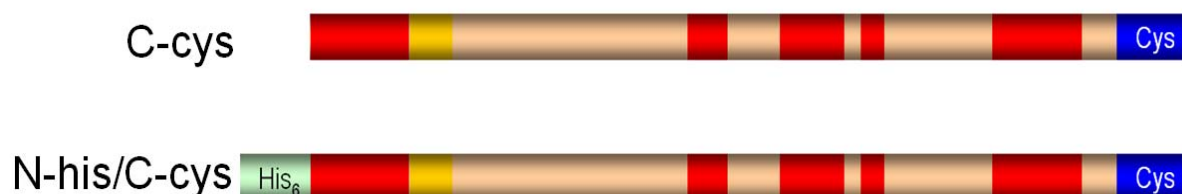


Abb. 4.4 Schematische Darstellung von rekombinantem Pferdeherz Cytochrom c mit C-terminalem Cys Tag (C-cys) und der Kombination aus N-terminalem His Tag und C-terminalem Cys Tag (N-his/C-cys).

4.2 Klonierung der Immobilisierungstags

Als Matrize für die Klonierung der verschiedenen Tags, diente der von [Rumbley *et al.* 2002] entwickelte Expressionsvektor pJRhrsN2 (siehe Kapitel 3.4.1), der das Wildtypgen des Pferdeherz Cyt c trägt (Abbildung 4.2). Die Nukleotidsequenz des Wildtypgens wurde mittels PCR modifiziert. Die rekombinanten PCR-Fragmente wurden in einen Expressionsvektor ligiert und in *E. coli* Zellen transformiert.

Ein optimiertes Cyt c Gen mit N-terminalem His Tag wurde uns von [Rumbley *et al.* 2002] als Expressionskonstrukt pJRopti1 zur Verfügung gestellt. In diesem Konstrukt befindet sich zwischen dem N-Terminus des Cyt c Gens und dem His Tag eine kurze Peptidsequenz. Die Sequenz Ile-Glu-Gly-Arg enthält eine Faktor Xa Protease-Schnittstelle, über die sich der His Tag entfernen lassen sollte [Rumbley *et al.* 2002].

Die von [Rumbley *et al.* 2002] erhaltenen Expressionsvektoren pJRhrsN2 und pJRopti1 wurden in *E. coli* XL1-Blue retransformiert. Zur Vervielfältigung der Plasmid-DNA, wurden die transformierten Zellen, wie unter 3.5.1 beschrieben, kultiviert und anschließend eine Maxipräparation der Plasmid-DNA (3.5.2) durchgeführt. Die Ausbeute der Plasmid-DNA wurde anhand der Ethidiumbromidfluoreszenz durch Vergleich mit einem Größen- und Mengenstandard in einem Agarosegel abgeschätzt (3.5.2). Die Ausbeute betrug für pJRhrsN2 ca. 1 µg/ml und für pJRopti1 ca. 1,25 µg/ml.

4.2.1 PCR Amplifikation

Das Einbringen der Tag kodierenden Sequenzen am 5'- bzw. 3'-Ende des Wildtypgens erfolgte mittels PCR mit spezifischen Primern, die in Abbildung 4.5 und Abbildung 4.6 gezeigt sind.

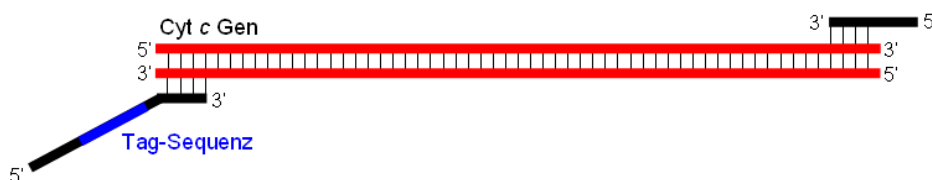


Abb. 4.5 Schematische Darstellung des PCR basierten Mutationsprinzips zum Einfügen der Tag-Sequenzen am N- bzw. C-terminalen Ende des Cyt c Gens.

Insgesamt wurden vier PCR Reaktionen durchgeführt. Eine Übersicht über die benutzten Primerpaare, mit den darauf kodierenden Regionen, ist nachfolgend gezeigt (Abbildung 4.6). Die Schmelztemperatur T_m wurde, wie unter 3.5.2 beschrieben, errechnet. In rot dargestellt sind zur Matrize komplementäre Abschnitte. Restriktionsschnittstellen, über die die Ligation erfolgen sollte, sind unterstrichen. Der für den Affinitätstag kodierende Bereich ist grau unterlegt. Ebenfalls gekennzeichnet sind Start- und Stoppkodons für die Proteinbiosynthese. Der Primer FS_His_b5 trägt eine zusätzliche nicht zum Template homologe EcoRI Restriktionsschnittstelle, über die ursprünglich, analog zu den Modifikationen von [Rumpley *et al.* 2002], die Ligation in den Expressionsvektor erfolgen sollte. Tatsächlich wurde später die ebenfalls auf dem Primer enthaltene KpnI Restriktionsschnittstelle zur Ligation genutzt.

Alle PCR Reaktionen erfolgten nach dem in Tabelle 4.1 dargestellten Schema und führten in allen Fällen zur Amplifikation des gewünschten Inserts.

Tab. 4.1 Schema der PCR Zyklen mit entsprechenden Inkubationstemperaturen

Phase	Zeit	Temp.	
1. Denaturierung	150 sec	94°C	
Denaturierung	30 sec	94°C	} 30 Zyklen
Annealing	30 sec	57°C	
Elongation	30 sec	72°C	
Cooling	unendlich	4°C	

Nach der PCR Amplifikation erfolgte die Aufreinigung der Fragmente mit Hilfe einer Phenol-Chloroform Extraktion mit anschließender Ethanol-Präzipitation (siehe Kapitel 3.5.2).

PCR 1: Insert *C-his*: C-Terminaler His Tag:

Primer 1: 5' Oligo: (FS_His_b5); $T_m = 66^\circ\text{C}$

KpnI

5'-TTACGAATTCGAGCTCGGTACC-3'

Primer 2: 3'Oligo: (FS_His_b3cor); $T_m = 60^\circ\text{C}$

BamHI Stopp His₆

5'-GGCCGGATCC-TTA-GTGATGATGATGATGATGTTCGTTAGTAGCCTTCTTCAAG-3'

PCR 2: Insert *NC-his*: C-Terminaler His Tag + N-Terminaler His Tag:

Primer 1: 5' Oligo: (FS_His_a5n) = N-terminaler HIS; $T_m = 62^\circ\text{C}$

KpnI Met His₆

5'-TTACGGTACC-ATG-CACCATCATCATCATCATGGTGACGTTGAAAAGGGTAAG-3'

Primer 2: 3'Oligo: (FS_Cys_c3); $T_m = 62^\circ\text{C}$

BamHI Stopp Cys₂ Linker

5'-GGCCGGATCC-TTA-ACAACAAGCACCACCACTGTATTCGTTAGTAGCCTTCTTCAAG-3'

PCR 3: Insert *C-cys*: C-Terminaler Cys Tag:

Primer 1: 5' Oligo: (FS_His_b5) enthält bereits KpnI-Schnittstelle!; $T_m = 66^\circ\text{C}$

KpnI

5'-TTACGAATTCGAGCTCGGTACC-3'

Primer 2: 3'Oligo: (FS_Cys_c3); $T_m = 62^\circ\text{C}$

BamHI Stopp Cys₂ Linker

5'-GGCCGGATCC-TTA-ACAACAAGCACCACCACTGTATTCGTTAGTAGCCTTCTTCAAG-3'

PCR 4: Insert *N-his/C-cys*: C-Terminaler Cys Tag + N-Terminaler His Tag:

Primer 1: 5' Oligo: (FS_His_a5n) = N-terminaler HIS; $T_m = 62^\circ\text{C}$

KpnI Met His₆

5'-TTACGGTACC-ATG-CACCATCATCATCATCATGGTGACGTTGAAAAGGGTAAG-3'

Primer 2: 3'Oligo: (FS_His_b3cor) = C-terminaler HIS; $T_m = 60^\circ\text{C}$

BamHI Stopp His₆

5'-GGCCGGATCC-TTA-GTGATGATGATGATGATGTTCGTTAGTAGCCTTCTTCAAG-3'

Abb. 4.6 Übersicht der Primerpaare für die durchgeführten PCR Reaktionen

4.2.2 Ligation

Die PCR Fragmente sollten in den Vektor pJRhrsN2 ligiert werden. Dazu musste zunächst das Wildtyp Cyt c Gen ausgeschnitten werden. Hierzu wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI geschnitten. Die Aufreinigung des geschnittenen Vektors erfolgte nach der elektrophoretischen Auftrennung aus einem 0,75%igen Agarosegel mit der Elutionsmethode (3.5.2). Die PCR Produkte wurden mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten und die Fragmentbanden aus einem 2%igen Agarosegel isoliert. Für die Ligation wurden 1-2 µl geschnittener Vektor (ca. 50 µg) und ein Überschuss an geschnittenem Insert, wie unter 3.5.2 beschrieben, für 2-3 h bei RT inkubiert. Zur Kontrolle auf Selbstligation wurde ein Ligationsansatz mit 5 µl geschnittenem Vektor, aber ohne Zugabe von PCR Fragmenten durchgeführt.

4.2.3 Transformation und Selektion

Nach der Ligation erfolgte die Transformation der Ligationsprodukte in *E. coli XL1-Blue* Zellen, mit anschließender Selektion auf positive Klone (3.5.2). Die Selektion erfolgte auf ampicillinhaltigem LB-Agar. Auf diesem Medium können nur Bakterien wachsen, die über eine Ampicillinresistenz verfügen. Der Expressionsvektor trägt ein Ampicillin Resistenzgen, sodass Bakterien, die diesen Vektor aufgenommen haben in der Lage sind, auf ampicillinhaltigen Medien zu wachsen und Kolonien zu bilden. Alle Ansätze bei denen die Inserts mit dem geschnittenen Vektor ligiert wurden, lieferten >>100 Kolonien pro Platte. Die Selbstligationsansätze zeigten dagegen nur eine sehr geringe Kolonienzahl (10-20 pro Platte). Somit kann von einer sehr geringen Selbstligationsrate ausgegangen werden und auf eine hohe Effizienz der Ligation zwischen Vektor und jeweiligem Insert geschlossen werden. Von den Ligationsansätzen (Vektor und Insert) wurden 10-20 Kolonien einzeln mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in jeweils 5 ml ampicillinhaltiges LB-Medium überführt. Die Vermehrung der Zellen erfolgte ÜN bei 37°C im Rotationsinkubator. Die Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse (3.5.2) isoliert und einem Kontrollverdau unterzogen. Hierzu wurde die gereinigte Plasmid-DNA mit BamHI und KpnI verdaut, um die Klone zu identifizieren, die tatsächlich das rekombinante Insert tragen. Das Ergebnis des Kontrollverdaus wurde mit Hilfe eines 2%igen Agarosegels überprüft. Für alle vier rekombinanten Konstrukte wurden positive Klone gefunden (Abbildung 4.7). Diese Zellen wurden vermehrt und daraus mit Hilfe einer Plasmid Maxi-Präparation die Expressionsvektoren pJRhrsN2-Chis, pJRhrsN2-NChis, pJRhrsN2-Ccys und pJRhrsN2-NhisCcys aufgereinigt.

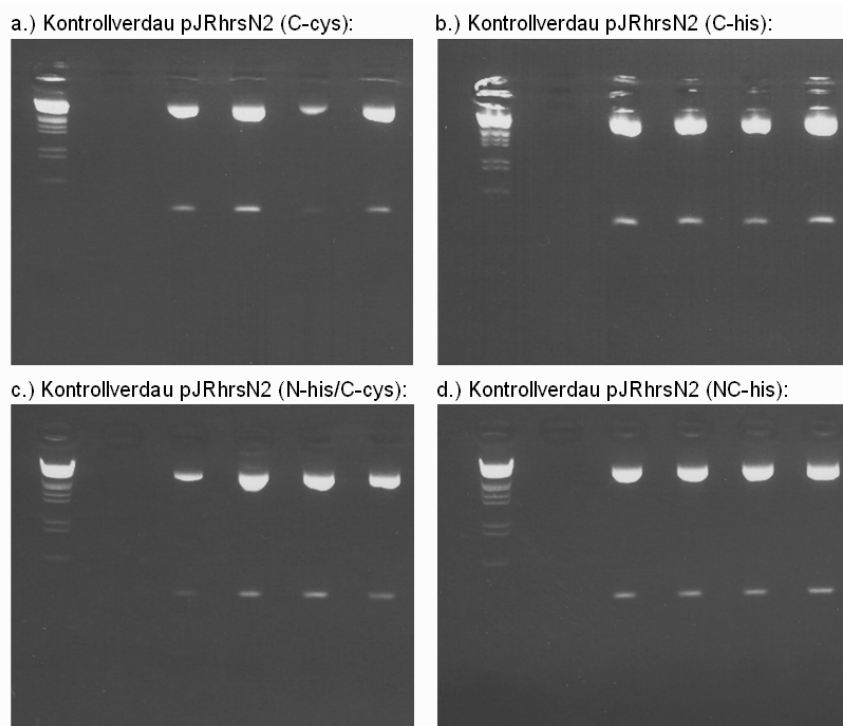


Abb. 4.7 Doppelverdau mit KpnI/BamHI zur Identifikation positiver Klone. Plasmid-DNA von je 4 zufällig ausgewählten Bakterienklonen im 2%-igen Agarosegel. Vektorgröße (pJRhrsN2) ca. 4200 Bp. Jeweils links aufgetragen ist λ -DNA Marker (Vergleiche Abb. 3.3). Die unterste Bande des Markers entspricht einem 564 Bp großen DNA Fragment.

4.3 Proteinexpression

Zur Expression der rekombinanten Cyt c Varianten mussten die Expressionsvektoren in einen für hohe Proteinausbeuten optimierten Expressionsstamm retransformiert werden. Die Retransformation in *E. coli* BL21 (DE3), der bei [Rumbley *et al.* 2002] die höchsten Ausbeuten erzielte, schlug fehl. Deshalb erfolgte die Retransformation in den Stamm *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL. Auch der für Wt Cyt c kodierende Vektor pJRhrsN2 und der für den N-terminalen His Tag kodierende pJRoPt1 wurden in diesen *E. coli* Stamm retransformiert.

Die Proteinexpression aller rekombinanten Konstrukte und des Wildtyps erfolgte nach [Rumbley *et al.* 2002], wie unter 3.5.1 beschrieben. Hierbei wurde eine Inkubationstemperatur von 30°C und ein Zeitraum von 50 h gewählt, da unter diesen Bedingungen die größten Ausbeuten zu erwarten waren [Rumbley *et al.* 2002]. Obwohl das Cyt c Gen unter der Kontrolle des P(lac) Promotors steht, wurde auf eine IPTG Induktion

verzichtet, da sich hierdurch keine Steigerung der Ausbeute erzielen ließ [Rumbley *et al.* 2002]. Die Zellen wuchsen in allen Fällen gut an. Ab einer Inkubationszeit von etwa 20 h, zeigte sich bei fast allen Ansätzen eine allmählich zunehmende Verfärbung der Zellkultur von ursprünglich braungelb über hellbraun-rosa, bis hin zu einem dunklen Rot nach etwa 50 h. Lediglich der Expressionsansatz des rekombinanten Cyt c mit N-his/C-cys Tag zeigte keine Rotfärbung. Die allmähliche Verfärbung der Kulturen deutet auf die Expression von Cyt c hin, da Cyt c aufgrund der Häm-Gruppe rot gefärbt ist. Die Tatsache, dass sich eine Kultur nicht rot verfärbte, kann damit erklärt werden, dass hier entweder kein oder nur sehr wenig Cyt c exprimiert wurde, oder der Einbau der Häm-Gruppe in das exprimierte Cyt c nicht korrekt erfolgte.

4.4 Proteinaufreinigung

Für die Aufreinigung des rekombinanten Cyt c wurden die Zellen, wie unter 3.5.3 beschrieben, aufgeschlossen. Die Zellyse erfolgte entweder in 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0 oder für alle His getaggtten Konstrukte in 50 mM Natriumphosphatpuffer mit 300 mM NaCl und 10 mM Imidazol, pH 8,0. Hierbei wurde das exprimierte Cyt c aus den Zellen freigesetzt und in Lysepuffer überführt. Für die Aufreinigung des Cyt c aus dem Lysat wurden zwei unterschiedliche chromatographische Trennverfahren eingesetzt. Das rekombinant hergestellte Wt Protein, sowie Cyt c mit C-terminalem Cys Tag (C-cys) ließen sich über Ionenaustauschchromatographie aufreinigen (siehe 3.5.3). Die Aufreinigung über eine Kationenaustauschsäule wird aufgrund der positiven Nettoladung von Cyt c in der Literatur als Standardverfahren beschrieben [Margoliash und Walasek 1967; Sherman *et al.* 1968]. Die Effizienz, der auf diese Weise durchgeführten Aufreinigung des rekombinanten Wt Cyt c und des Cyt c (C-cys), konnte mit bloßem Auge beobachtet werden. Pro Aufreinigung wurden mehrere Eluatfraktionen von jeweils 1 ml gesammelt. Dabei zeigte sich in den Eluatfraktionen 2 und 3 die stärkste Rotfärbung. Da jedoch auch andere positiv geladene Proteine an das Säulenmaterial binden, reicht dieser Aufreinigungsschritt alleine nicht aus, um Cyt c zu reinigen. Aufgrund der guten Löslichkeit von Cyt c, bietet sich eine Ammoniumsulfatfällung als anschließender Aufreinigungsschritt an. Während nahezu alle Proteine bei hohen Ammoniumsulfatkonzentrationen ausfallen, bleibt Cyt c selbst bei über 55% Sättigung in Lösung [Sherman *et al.* 1968]. Nach einer Zentrifugation wurde die immer noch deutlich rot gefärbte Cyt c Lösung abgenommen. Zum Entfernen des Ammoniumsulfats wurde gegen 5,78 mM Phosphatpuffer pH 7,0 dialysiert.

Alle His getaggtten Cyt c Varianten wurden affinitätschromatographisch über NiNTA Agarose aufgereinigt. Diese chromatographische Methode wird routinemäßig für die Aufreinigung His getaggtter Proteine benutzt. Der His Tag bindet an die NiNTA Domänen der Säulenmatrix. Alle anderen Proteine können ausgewaschen werden. Die Elution der His getaggtten Proteine erfolgte kompetitiv mit hohen Konzentrationen Imidazol (250 mM). Auch bei dieser Methode ließ sich die Aufreinigung über die rote Färbung verfolgen. Die Eluatfraktionen wurden zum Entfernen des Imidazols dialysiert. Die Proteinausbeuten beider Aufreinigungsvarianten wurden nach [Bradford 1976] bestimmt und sind in Tabelle 4.2 als relative Ausbeuten bezogen auf einen Liter Zellkulturvolumen angegeben. Die Angabe der Proteinmenge in Milligramm pro Liter Zellkulturvolumen ermöglicht den direkten Vergleich mit den von [Rumbley *et al.* 2002] beschriebenen Proteinausbeuten. Die Effizienz der Expression der rekombinanten Cyt c Varianten und der einzelnen Aufreinigungsschritte wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung mit einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel und anschließender Coomassie Färbung überprüft. Abbildung 4.8 zeigt die Ergebnisse beider Aufreinigungsmethoden exemplarisch anhand von Cyt c (C-cys) und Cyt c (NC-his).

Durch Zugabe von hohen Salzkonzentrationen (500 mM NaCl bei Ionenaustauschchromatographie; 250 mM Imidazol bei Affinitätschromatographie), ließ sich das Zielprotein von der Säule eluieren. In den Eluatfraktionen aller aufgereinigter Proteinkonstrukte zeigte sich die für Cyt c charakteristische Bande bei etwa 14,4 kDa. Pferdeherz Cyt c hat ein Molekulargewicht von 12,38 kDa. Das im Gel angefärbte rekombinante Cyt c zeigte somit ein apparent etwas größeres Molekulargewicht. Der gleiche Effekt zeigte sich bei kommerziellem Cyt c und könnte auf eine nicht vollständige Denaturierung der Proteine zurückzuführen sein. Darüber hinaus ist bekannt, dass bei Proteinen, die viele polare Aminosäuren enthalten, das tatsächliche Molekulargewicht ein anderes sein kann, als das errechnete [Mowatt und Clayton 1988; Ramachandran *et al.* 1998]. Neben der Bande von Cyt c zeigten sich in den Eluatfraktionen, unabhängig von der Aufreinigungsmethode, noch weitere schwache Banden. Diese stammen von Proteinen, die ebenfalls an das Säulenmaterial gebunden haben. Um diese Proteine zu entfernen wurden die Eluatfraktionen vereinigt, mit Ammoniumsulfat gefällt und anschließend dialysiert. Der Erfolg der Aufreinigung zeigt sich im SDS-Proteingel. Nach Ammoniumsulfatfällung und Dialyse sind keine Kontaminationsbanden mehr zu erkennen. Neben der Bande von Cyt c bei etwa 14,4 kDa finden sich ein bis zwei weitere prominente Banden bei etwa doppeltem und dreifachem Molekulargewicht von Cyt c. Diese Proteinbanden finden sich auch bei der

gelelektrophoretischen Auftrennung von kommerziellem Cyt c und repräsentieren eine Dimer- und Trimerform von Cyt c. Die Gesamtausbeute von Cyt c wurde vor und nach der Ammoniumsulfatfällung nach der Methode von [Bradford 1976] bestimmt (Tabelle 4.2).

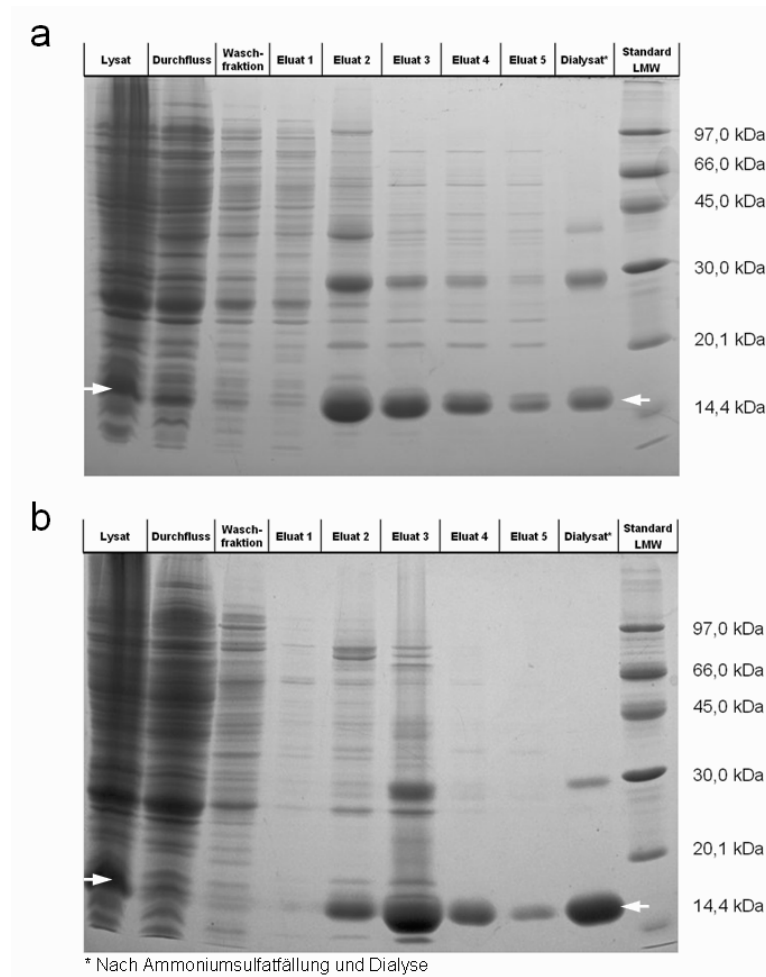


Abb. 4.8 Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgele von Proben der einzelnen Protein Aufreinigungsschritte: (a) für Cyt c (C-cys); (b) für Cyt c (NC-his). Für Cyt c charakteristische Banden sind durch Pfeile markiert. Zum Vergleich aufgetragen ist ein LMW Größenstandard. Die Größen der Standardproteine sind angegeben.

Im Lysat der Expressionsansätze zeigte sich eine prominente Proteinbande in der Größenordnung von Cyt c, die auf eine Überexpression hindeutet. Diese Bande wurde bei allen Cyt c Expressionsansätzen mit Ausnahme von Cyt c (N-his/C-cys) beobachtet und lässt darauf schließen, dass alle Konstrukte bis auf Cyt c (N-his/C-cys) überexprimiert wurden. Auch mit anderen, unabhängigen Klonen, ließ sich Cyt c (N-his/C-cys) nicht exprimieren. Sowohl bei der Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie, als auch bei der mittels Affinitätschromatographie, erschien diese Bande im Durchfluss deutlich schwächer

und war in der Waschfraktion beinahe nicht mehr erkennbar. Das lässt eine effiziente Bindung des Zielproteins an die jeweilige Säulenmatrix vermuten.

Tab. 4.2 Aus den Eluatfraktionen bestimmte Gesamtausbeuten aller rekombinanter Cyt c Varianten, bestimmt nach [Bradford 1976] vor und nach der Ammoniumsulfatfällung. Die Ausbeuten sind in Milligramm pro Liter Zellkulturvolumen angegeben. Die jeweilige Aufreinigungsmethode Ionenaustauschchromatographie (IAC) bzw. Affinitätschromatographie (AC) ist angegeben.

Cyt c Konstrukt	Aufreinigung	Protein Ausbeute [mg/L]	Protein Ausbeute nach Ammoniumsulfatfällung [mg/L]
Cyt c (Wt)	IAC	18	2,8
Cyt c (C-cys)	IAC	22	3,7
Cyt c (N-his)	AC	54	-
Cyt c (C-his)	AC	45	12
Cyt c (NC-his)	AC	48	3,8
Cyt c (N-his/C-cys)	AC	0	-

Die Aufreinigung von Cyt c (Wt) und Cyt c (C-cys) mittels Kationenaustauschchromatographie erzielte vergleichbare Gesamtausbeuten von etwa 20 mg/L Protein. Die Ammoniumsulfatfällung führte in beiden Fällen zu deutlichen Verlusten an Cyt c. Zwar wurden mit der Ammoniumsulfatfällung kontaminierende Proteine entfernt, sie ist aber nicht spezifisch und präzipitiert offenbar auch Teile des Cyt c.

Deutlich höhere Gesamtausbeuten wurden bei der affinitätschromatographischen Aufreinigung der His getaggten Proteine erzielt. Die Ausbeuten lagen für alle Konstrukte in derselben Größenordnung und nur geringfügig unter den maximalen von [Rumbley *et al.* 2002] berichteten Ausbeuten (60-65 mg/L). Dieses demonstriert die hohe Spezifität und Effizienz dieser Aufreinigungsmethode. Durch die Ammoniumsulfatfällung kommt es auch hier zu großen Ausbeuteverlusten. Für Cyt c (N-his) wurde keine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt, da sich im Eluat nur sehr wenige kontaminierende Banden zeigten.

Es bleibt festzuhalten, dass alle rekombinanten Cyt c Konstrukte, mit Ausnahme von Cyt c (N-his/C-cys), erfolgreich exprimiert und aufgereinigt werden konnten. Trotz der hohen Verluste während der Ammoniumsulfatfällung, waren die erzielten Ausbeuten für die weiterführenden Untersuchungen vollkommen ausreichend.

4.5 Untersuchung auf Funktionalität

Nach der erfolgreichen Proteinaufreinigung wurde überprüft, ob das Cyt c funktional war. Aufgrund der intrinsischen Häm-Gruppe können Chromoproteine sehr gut mittels UV/VIS Spektroskopie charakterisiert werden und zeigen im Spektrum spezifische Absorptionspeaks [Will *et al.* 1983]. Die Spektren von oxidiertem und reduziertem Cyt c unterscheiden sich deutlich voneinander. Reduziertes Cyt c zeigt drei charakteristische Absorptionsbanden. Bei einer Wellenlänge von 416 nm liegt die Soret-Bande. Zusätzlich absorbiert reduziertes Cyt c bei einer Wellenlänge von 520 nm (β -Bande) und 550 nm (α -Bande) [Margoliash und Walasek 1967; Winogradov *et al.* 1972; Stade und Brambl 1980]. Bei oxidiertem Cyt c verschmelzen α - und β -Bande zu einem Peak bei 530 nm. Außerdem ist die Soret-Bande nach 410 nm verschoben [Margoliash und Walasek 1967; Winogradov *et al.* 1972; Stade und Brambl 1980]. Dieses Absorptionsverhalten ist auf die Häm-Gruppe zurückzuführen und beruht auf dem π - π^* Übergang des Porphyrinrings. Die Aminosäurekette besitzt aufgrund von aromatischen Aminosäureseitengruppen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Da die aufgereinigten Cyt c Varianten teilweise oxidiert oder reduziert vorlagen, wurde oxidiertes Cyt c durch Zugabe von Natriumdithionit in die reduzierte Form überführt. Natriumdithionit absorbiert bei Wellenlängen < 380 nm stark. Deshalb wurden die Absorptionsspektren zwischen 380 nm und 600 nm aufgenommen, da hieraus ersichtlich wird, ob die Häm-Gruppe korrekt in das Protein eingebaut ist. Alle Spektren wurden mit dem Spektrum von nativem Cyt c aus Pferdeherz verglichen (Abbildung 4.9). In Abbildung 4.9 a ist das Spektrum von nativem (kommerziellem) Pferdeherz Cyt c gezeigt. Dieses liegt in oxidiertem Form vor. Die Soret-Bande bei 410 nm ist zu erkennen. Durch Zugabe von Natriumdithionit wurde das Protein reduziert (Abbildung 4.9 b). Deutlich zu erkennen sind die definierten Absorptionsbanden bei 520 nm und 550 nm, sowie die leicht verschobene Soret-Bande. Die Graphen 4.9 c-g zeigen die Absorptionsspektren aller rekombinanten Cyt c Varianten. Außer Cyt c (N-his) lagen alle anderen Proteine nach der Aufreinigung in reduzierter Form vor. Cyt c (N-his) wurde durch Zugabe von Dithionit in die reduzierte Form überführt. Alle Spektren zeigen die charakteristische Soret-Bande und die für reduziertes Cyt c charakteristische Absorption bei 520 nm und 550 nm. Lediglich die Lage der Soret-Bande des rekombinanten Wildtyps liegt mit einem Maximum von 411 nm eher im Bereich der Bande von oxidiertem Cyt c. Da gleichzeitig die Banden bei 520 nm und 550 nm deutlich schwächer ausgeprägt sind, muss davon ausgegangen werden, dass das aufgereinigte Protein teilweise in oxidiertem und teilweise in reduzierter Form vorlag.

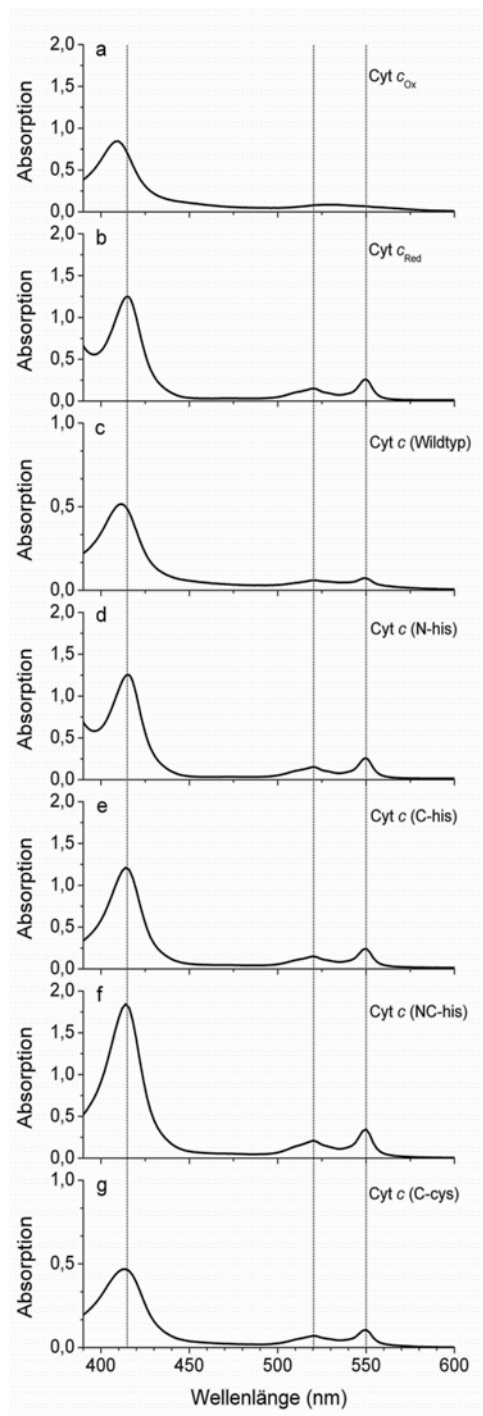


Abb. 4.9 UV/VIS Spektren der aufgereinigten Cyt c Varianten. Zum Vergleich wurde das Absorptionsspektrum von kommerziellem Cyt c aus Pferdeherz im Wellenlängenbereich zwischen 380 nm und 600 nm gemessen. Alle rekombinanten Proteine wurden im reduzierten Zustand untersucht: (a) Kommerzielles Cyt c in oxidiertem Zustand; (b) Kommerzielles Cyt c nach Zugabe von Dithionit; (c) Rekombinantes Wt Cyt c; (d) Cyt c (N-his) nach Zugabe von Dithionit; (e) Cyt c (C-his); (f) Cyt c (NC-his); (g) Cyt c (C-cys).

Die unterschiedliche Höhe der Absorptionsmaxima lässt sich mit unterschiedlichen Cyt c Konzentrationen erklären. Die Lage und Form der UV/VIS Banden kann als Nachweis gewertet werden, dass die Häm-Gruppe korrekt in das Protein eingebaut wurde. Eine Verknüpfung der Häm-Gruppe in falscher Orientierung hätte aufgrund der geänderten Koordinationsbindung zu einem deutlich abweichenden Spektrum geführt [Santoni *et al.* 2004; Chen *et al.* 2007; Monien *et al.* 2007]. Die Absorptionsbanden können genutzt werden, um die Konzentration des Cyt c zu bestimmen. Hierzu wurden die Absorptionsspektren von kommerziellem, reduziertem Cyt c aufgenommen. Für die Messungen wurden Proteinkonzentrationen zwischen 2 µM und 20 µM verwendet und anschließend die Peakhöhe der Soret-Bande gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen. Anhand dieser Kalibrierung ließen sich die Proteinkonzentrationen der rekombinant hergestellten Proben bestimmen. Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zur Bestimmung des Proteingehaltes nach [Bradford 1976] alle Proben niedriger konzentriert waren. Die UV/VIS spektroskopisch bestimmten Gesamtausbeuten von Cyt c und im Vergleich dazu die nach [Bradford 1976] bestimmten Ausbeuten sind in Tabelle 4.3 gezeigt. Auch hier sind die Proteinausbeuten analog zu Tabelle 4.2 auf das Kulturvolumen bezogen, um eine Vergleichbarkeit mit den Literaturwerten zu ermöglichen.

Tab. 4.3 Vergleich der Gesamtausbeuten von rekombinantem Cyt c, ermittelt nach [Bradford 1976] bzw. aus den Absorptionsmaxima der Soret-Bande in reduzierter Form mittels UV/VIS Spektroskopie. Die Ausbeuten sind in Milligramm pro Liter Zellkulturvolumen angegeben. Die jeweilige Aufreinigungsmethode Ionenaustauschchromatographie (IAC) bzw. Affinitätschromatographie (AC) ist angegeben.

Cyt c Konstrukt	Aufrei- nigung	Proteinbestimmung nach Bradford		UV/VIS Spektrum (λ_{416nm})	
		Protein Ausbeute [mg/L]	Protein Ausbeute nach Ammoniumsulfatfällung [mg/L]	Cyt c Ausbeute [mg/L]	Cyt c Ausbeute nach Ammoniumsulfatfällung [mg/L]
Cyt c (Wt)	IAC	18	2,8	-	1,1
Cyt c (C-cys)	IAC	22	3,7	5,3	2,2
Cyt c (N-his)	AC	54	-	12,5	-
Cyt c (C-his)	AC	45	12	10,5	3,3
Cyt c (NC-his)	AC	48	3,8	15	2,2

Wie sich zeigte lagen die Proteinausbeuten bei nur 20-30% des nach [Bradford 1976] bestimmten Wertes. Nach Ammoniumsulfatfällung und Dialyse lagen sie immer noch 40-60%

unter den nach [Bradford 1976] bestimmten Cyt c Ausbeuten. Die Verunreinigung der Eluatfraktionen mit anderen Proteinen scheidet als alleinige Erklärung für die abweichenden Proteinmengen aus. Die Absorption bei 410 nm erfolgt durch die Porphyringruppe des Häms und gibt somit nur Auskunft über die Häm-Konzentration. Offenbar war nur ein Teil der rekombinanten Cyt c Proteine mit einer Häm-Gruppe beladen. Die Verknüpfung der Häm-Gruppe mit dem Apocytochrom c wird durch das Enzym Häm-Lyase katalysiert [Dumont *et al.* 1987]. Aus diesem Grunde wurde zur rekombinanten Expression von Cyt c in *E. coli* von [Pollock *et al.* 1998] ein Tandemgen entwickelt, das neben Cyt c auch Häm-Lyase aus *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Trotz Verwendung dieses Tandemgens waren die Cyt c Ausbeuten gering [Rumbley *et al.* 2002]. Eine nicht vollständige Beladung des rekombinanten Cyt c mit Häm-Gruppen kann z.B. mit einer niedrigen Expressionsrate oder eingeschränkten Funktionalität der Häm-Lyase erklärt werden. Denkbar ist auch, dass es bei hohen Expressionsraten von Cyt c zu einer Limitierung in der Versorgung mit der eisenhaltigen Porphyringruppe kommt, oder einige Cyt c Proteine Fehlfaltungen aufweisen, die den Einbau der Häm-Gruppe verhindern. Bei den weitergehenden Untersuchungen muss somit berücksichtigt werden, dass nur etwa 40-60% des eingesetzten Cyt c tatsächlich mit Häm beladen und somit potentiell redoxaktiv sind.

In den Mitochondrien dient Cyt c als Elektronenüberträger zwischen dem Cyt *bc*₁ Komplex und der Cyt c Oxidase. Natives Cyt c kann von der Reduktase reduziert und von der Oxidase oxidiert werden. Diese Reaktion lässt sich nutzen, um die Funktionalität des rekombinant hergestellten Cyt c zu überprüfen. Der Oxidationszustand des Cyt c wurde mittels eines photochemischen Enzymtests *in vitro* untersucht, da zwischen beiden Redoxzuständen aufgrund des unterschiedlichen Absorptionsverhaltens unterschieden werden kann. Hierzu wurde ein photochemischer Enzymtest zur Aktivitätsmessung von Cyt c Reduktase [Sigma 2002] verwendet. Standardmäßig wird bei der Messung eine definierte Menge an kommerziellem Cyt c von der Reduktase reduziert. Die Umsatzrate ist ein Maß für die enzymatische Aktivität der Reduktase. Zum Nachweis der Funktionalität von rekombinantem Cyt c, wurde dieses Protokoll in abgewandelter Form verwendet (siehe Kapitel 3.7.1). Hierzu musste das Cyt c in oxidiert Form vorliegen. Da die meisten Aufreinigungsfractionen reduziertes Cyt c enthielten, wurde dieses durch Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat(III) in die oxidierte Form überführt. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion (Abbildung 4.10) durch Zugabe von Cyt c Reduktase ($\geq 0,05$ U/ml), zusammen mit einer ausreichenden Menge Reduktionsäquivalent β -NADH (ca. 1 mM) gestartet. Vor und nach der

Zugabe erfolgte die Aufzeichnung des Absorptionsspektrums zwischen 480 nm und 600 nm. Zur Kontrolle wurde auch kommerzielles Cyt c vermessen (Abbildung 4.10 a).

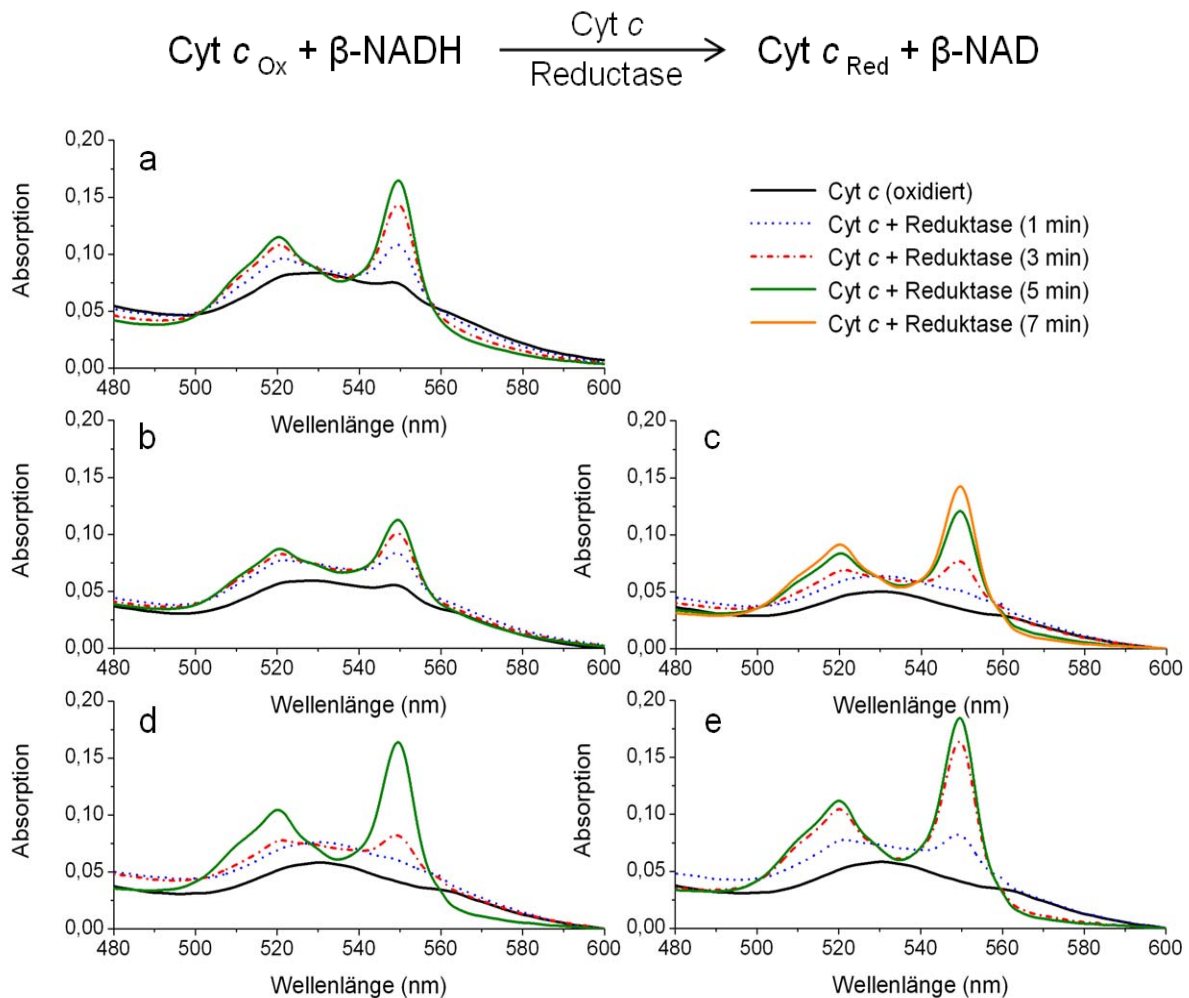


Abb. 4.10 UV/VIS Spektren der unterschiedlichen rekombinanten Cyt c Varianten im Wellenlängenbereich zwischen 480 nm und 600 nm vor und jeweils 1 min, 3 min, 5 min und 7 min nach Zugabe von Cyt c Reduktase und NADH: (a) Kommerzielles Cyt c; (b) Cyt c (N-his); (c) Cyt c (C-his); (d) Cyt c (NC-his); (e) Cyt c (C-cys).

In den meisten Fällen zeigte das vor der Enzymzugabe aufgezeichnete Spektrum die für den oxidierten Zustand typische Bande bei 530 nm. In einigen Fällen ist eine schwache Schulter bei 550 nm zu erkennen (Abbildung 4.10 a/b). Das bedeutet, dass das eingesetzte Cyt c nicht zu 100% in oxidiert Form vorlag. Bereits 1 min nach Zugabe der Reduktase zeigte sich fast überall ein verändertes Spektrum. Es sind die für reduziertes Cyt c charakteristischen Absorptionspeaks bei 520 nm und 550 nm zu erkennen. Mit zunehmender

Inkubationszeit nimmt die Höhe dieser Absorptionsbanden zu. Nach 5 bis 7 min Inkubationszeit war das Cyt c vollständig reduziert. Mit Hilfe dieses photochemischen Enzymtests konnte für alle rekombinanten Cyt c Varianten die Funktionalität, im Hinblick auf die Fähigkeit zur Interaktion mit Cyt c Reduktase, gezeigt werden. Die rekombinant hergestellten Proteine unterschieden sich diesbezüglich nicht von kommerziellem Cyt c. In einigen Fällen war eine längere Inkubationszeit bis zur vollständigen Reduktion erforderlich. Ursache hierfür könnten schwankende Konzentrationen des eingesetzten Kaliumhexacyanoferrat(III) gewesen sein. Nach Zugabe der Reduktase kann eine Reaktion von überschüssigem Kaliumhexacyanoferrat(III) mit β -NADH und bereits enzymatisch reduziertem Cyt c nicht ausgeschlossen werden, wodurch sich die vollständige Reduktion des Cyt c verzögert hätte (Abb. 4.10 c/d).

Die bisherigen Erkenntnisse können wie folgt zusammengefasst werden: Alle rekombinant hergestellten Cyt c Varianten, mit Ausnahme von Cyt c (N-his/C-cys), wurden mit guter Ausbeute exprimiert und aufgereinigt. Durch eine Ammoniumsulfatfällung konnte Cyt c weiter angereichert werden. Gleichzeitig kam es aber zur teilweisen Co-Präzipitation von Cyt c, wodurch die Gesamtausbeute deutlich reduziert wurde. Die UV/VIS spektroskopischen Untersuchungen haben gezeigt, dass maximal 40-60% des rekombinanten Cyt c mit einer Häm-Gruppe beladen sind. Mit Hilfe des photochemischen Enzymtests konnte gezeigt werden, dass die Häm-beladenen, rekombinanten Cyt c Varianten mit Cyt c Reduktase interagieren können und von dem Enzym reduziert werden.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 Redoxverhalten von Cytochrom c auf makroskopischen Elektroden

Für die Immobilisierung von Redoxproteinen auf Elektrodenoberflächen steht eine Vielzahl unterschiedlicher Immobilisierungsstrategien zur Verfügung (Kapitel 2.3). Neben der kovalenten Immobilisierung des Proteins, gibt es die Möglichkeit der Physisorption an die Elektrodenoberfläche durch hydrophobe bzw. hydrophile Wechselwirkungen oder durch elektrostatische Bindung. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die gängigsten Immobilisierungsstrategien für Pferdeherz Cyt c und ihr Einfluss auf das Redoxverhalten vergleichend untersucht werden. In der Literatur findet sich eine breite Anzahl von elektrochemischen Untersuchungen zum Ladungstransfer von Cyt c auf makroskopischen Elektrodenoberflächen [Tarlov und Bowden 1991; Song *et al.* 1993; Feng *et al.* 1997; Avila *et al.* 2000; Murgida und Hildebrandt 2001; Leopold *et al.* 2002B; Niki *et al.* 2002; Ataka und Heberle 2003; Fedurco 2000]. Hierbei kamen unterschiedliche Immobilisierungsstrategien zum Einsatz [Tarlov und Bowden 1991; Heering *et al.* 2004; Xu *et al.* 2004; Yue und Waldeck 2005; Bortolotti *et al.* 2006; Ji *et al.* 2006; Nakano *et al.* 2007; De Wael *et al.* 2008]. Ziel der eigenen Untersuchungen war es, gängige Immobilisierungsstrategien zu reproduzieren, darauf aufbauend alternative Ansätze zu entwickeln und sie in Bezug auf das Redoxverhalten des immobilisierten Cyt c zu untersuchen. Hierbei sollten eine oder mehrere Immobilisierungsstrategien ermittelt werden, die eine hohe Oberflächenbedeckung der Elektrode mit Cyt c und gleichzeitig einen möglichst effizienten und reversiblen Ladungstransfer zwischen Elektrode und Protein gewährleisten. Die Charakterisierung des Redoxverhaltens von immobilisiertem Cyt c erfolgte an makroskopischen Au(111) Einkristalloberflächen. Dabei handelt es sich um ein Substratmaterial, das aufgrund seiner Eigenschaften als Elektrodenmaterial für elektrochemische Untersuchungen Verwendung findet und ausreichend charakterisiert wurde [Kolb 1996]. Durch seine Gitterausrichtung ergibt sich an der Oberfläche eine ideal hexagonale Anordnung der Atome. Der Atomabstand lässt sich durch Zuführen thermischer Energie weiter reduzieren, wodurch sich eine noch dichter gepackte und thermodynamisch stabilere Oberflächenstruktur ergibt [Takayanagi 1982; Barth *et al.* 1990]. Dieser Umlagerungsprozess in der oberen Atomlage, der zu einer Minimierung der Oberflächenenergie führt, wird auch als Rekonstruktion bezeichnet. Für elektrochemische Untersuchungen sollte die Elektrode im untersuchten Potentialmessbereich ideal polarisiert und der Doppelschichtbereich entsprechend

charakterisiert sein. Gold ist über einen großen Bereich ideal polarisierbar und zeigt in dem hier untersuchten Potentialbereich keine katalytische Aktivität. Für die Oberflächenimmobilisierung organischer Moleküle mit Thiolgruppen eignen sich Goldoberflächen aufgrund der starken Gold-Schwefel Wechselwirkung besonders gut.

5.1.1 Elektrostatische Immobilisierung auf selbstorganisierenden Monolagen

Aufgrund der Vielzahl von Lysingruppen auf der Proteinoberfläche von Cyt *c* [Timkovich 1975], ergibt sich im Bereich von pH 7 eine positive Nettoladung [Koppenol und Margoliash 1982], die für eine elektrostatische Anbindung des Proteins an eine selbstorganisierende Monolage (SAM) genutzt werden kann. Die Elektrodenoberfläche muss hierfür mit einer SAM beschichtet werden, die eine negativ geladene Kopfgruppe trägt. Umfangreiche elektrochemische Untersuchungen von Cyt *c* wurden mit carboxylterminierten Monolagen durchgeführt [Tarlov und Bowden 1991; Song *et al.* 1993; Avila *et al.* 2000; Leopold *et al.* 2002B; Niki *et al.* 2002; Ataka und Heberle 2003; Salomon 2005]. Neben der Carboxylgruppe zur Proteinimmobilisierung, tragen die Moleküle der SAM in der Regel eine endständige Thiolgruppe, über die die Bindung an die Goldoberfläche erfolgt. Bei der Wahl der SAM ist zu beachten, dass der Elektronentransfer zwischen Elektrode und Protein durch die SAM erfolgen muss. Es sind somit bevorzugt Moleküle zu wählen, von denen eine gute Elektronentransfercharakteristik bekannt bzw. zu erwarten ist. Besonders vielversprechend sind Moleküle mit delokalisierten π -Elektronensystemen, wie aromatische Verbindungen, die ein Springen der Elektronen zwischen Elektronenorbitalen ermöglichen [Krings *et al.* 2003]. Des Weiteren sind auch Moleküle mit kurzen Alkylketten für die Beschichtung der Elektrode geeignet, da sie aufgrund ihrer Kettenlänge einen effizienten Tunnelkontakt ermöglichen [Tarlov und Bowden 1991; Protsailo und Fawcett 2000; Avila *et al.* 2000].

Aliphatische Thioalkansäuren

Die meisten Untersuchungen zum Ladungstransferverhalten von immobilisiertem Cyt *c* erfolgten auf SAMs bestehend aus carboxylterminierten Thiolen. Thioalkansäuren bilden auf Goldoberflächen dichte und homogene Monolagen aus [Song *et al.* 1993; Salomon 2005] und ermöglichen eine homogene Adsorption von Proteinen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Au(111) Elektroden mit Thioalkansäuren unterschiedlicher Kettenlänge beschichtet und darauf Cyt *c* elektrostatisch immobilisiert. Anschließend erfolgte die elektrochemische Untersuchung des Redoxverhaltens mittels Zykelvoltammetrie. Die Graphen in

Abbildungen 5.1 a-d zeigen die Zyklovoltammogramme von Cyt c, immobilisiert auf unterschiedlichen Thioalkansäuren.

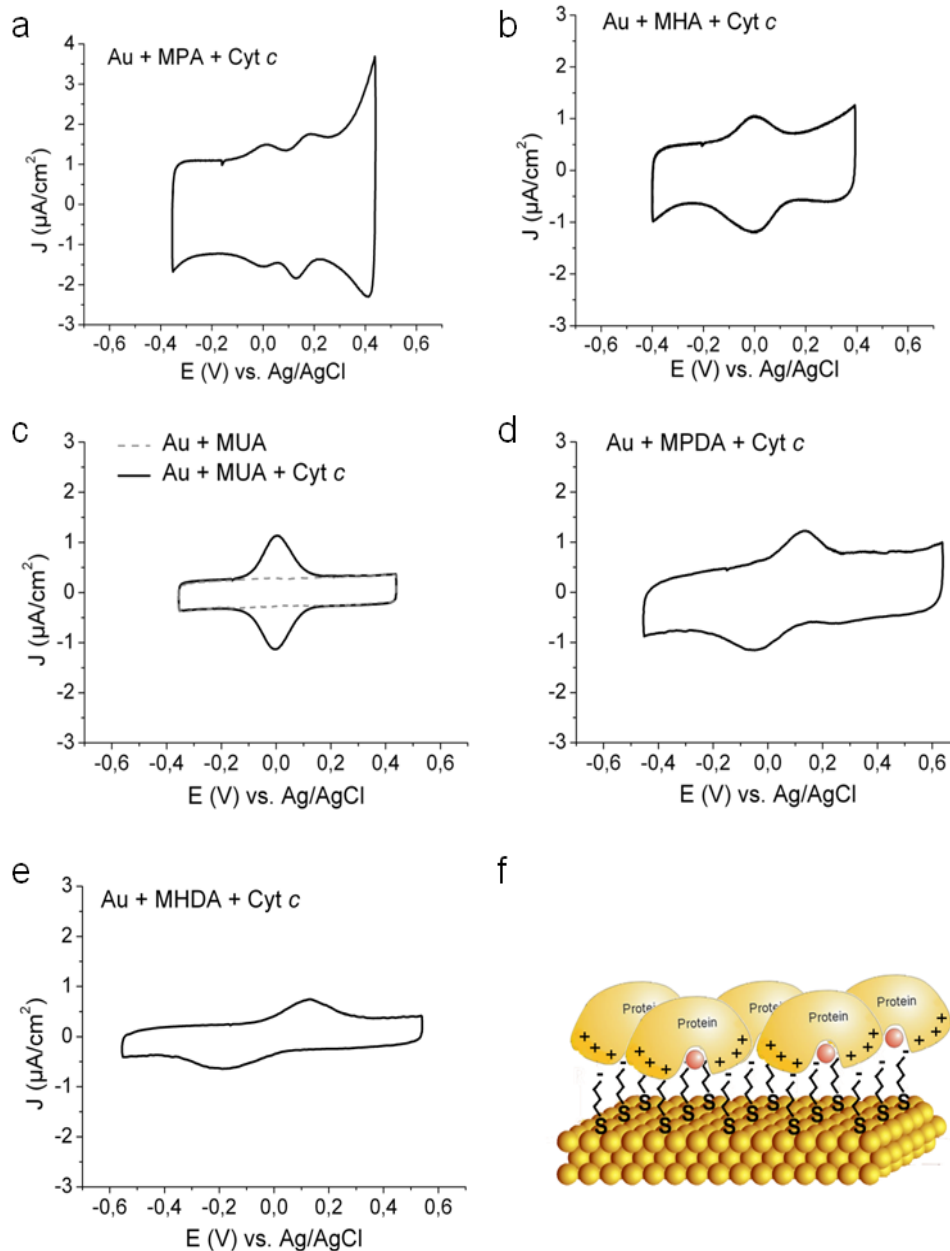


Abb. 5.1 Zyklovoltammogramme von Cyt c, immobilisiert auf MPA (a), MHA (b), MUA (c), MPDA (d), und MHDA (e) in Phosphatpuffer ($I = 5,78 \text{ mM}$, $\text{pH } 7,0$), bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s . (c) zeigt zusätzlich das Zyklovoltammogramm von MUA ohne Protein. Die Potentiale sind bezogen auf das Potential einer Ag/AgCl Referenzelektrode (3M KCl), als Gegenelektrode diente ein Platindraht. (f) Schematische Zeichnung der elektrostatischen Immobilisierung von Cyt c auf einer SAM aus Thioalkansäuren.

Es wurden 3-Mercaptopropionsäure (MPA), 6-Mercaptohexansäure (MHA), 11-Mercapto-undecansäure (MUA), 15-Mercaptopentadecansäure (MPHA) und 16-Mercaptohexadecansäure (MHDA) für die Ausbildung der SAM, wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben, verwendet. Das Zyklovoltammogramm wurde mit einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s aufgezeichnet und zeigt die Stromdichte J über dem angelegten Potential E , gemessen gegen das Potential einer Ag/AgCl Referenzelektrode (3M KCl). Abbildung 5.1 f zeigt schematisch die elektrostatische Immobilisierung von Cyt *c* auf einer SAM aus Thioalkansäuren.

Bei Betrachtung der Zyklovoltammogramme zeigt sich für alle untersuchten SAMs eine deutliche und stabile Redoxantwort, die auf das immobilisierte Cyt *c* zurückzuführen ist. Ohne immobilisiertes Redoxprotein ergaben sich, wie exemplarisch in Abbildung 5.1 c für MUA gezeigt, nur kapazitive Ströme. Die Peakströme sind auf die Oxidation und Reduktion des innerhalb der Häm-Gruppe von Cyt *c* lokalisierten Eisenatoms zurückzuführen und bestätigen, dass Cyt *c* an der Elektrode elektrochemisch oxidiert und reduziert wurde. Auffällig ist der Doppelpeak bei MPA. Neben dem Redoxpeak bei einem Potential von etwa 0 mV (Tabelle 5.1), das gut mit dem Literaturwert für das Formalpotential von Cyt *c* übereinstimmt [Song *et al.* 1993], ergab sich ein zweiter Redoxpeak bei einem Potential von etwa 150 mV. Dieser zweite Peak wurde auch von [Jiang *et al.* 1997; Salomon 2005] beschrieben und weist eine pH-Abhängigkeit der SAM von etwa 50 mV/Dekade auf. Als Erklärung für diesen Peak, der auch an Elektroden mit MPA ohne Protein auftrat [Salomon 2005], dient eine Protonierungs-/ Deprotonierungsreaktion an den Carboxylgruppen der MPA SAM [Jiang *et al.* 1997]. Es ist zu vermuten, dass die Kettenlänge von MPA und damit der geringe Abstand der Carboxylgruppe zur Elektrode, sowie der potentialabhängige pKa-Wert von MPA einen maßgeblichen Einfluss an dieser Reaktion haben. Neben dem beobachteten Doppelpeak war bei Potentialen über 200 mV ein starker Stromanstieg zu beobachten. Auch dieser Stromanstieg wurde bereits zuvor beschrieben [Salomon 2005] und zeigt, dass die mit MPA modifizierte Elektrode im untersuchten Potentialbereich nicht ideal polarisiert war.

Deutlich andere Ergebnisse wurden mit MHA und MUA erzielt. In beiden Fällen zeigten sich deutliche Oxidations- und Reduktionspeaks bei einem Formalpotential E_0 von etwa 0 mV (Tabelle 5.1). Auffällig bei MHA ist ein leicht vergrößerter Reduktionspeak im Vergleich zum Oxidationspeak. Dieses könnte auf einen teilweise irreversiblen Elektronentransfer hindeuten. Für MPDA und MHDA zeigten sich ebenfalls deutliche Redoxpeaks, bei denen die Peakpotentiale von Oxidation und Reduktion jedoch deutlich verschoben waren. Das Formalpotential, welches sich aus dem arithmetischen Mittel der Potentiale von Oxidations-

und Reduktionspeak errechnet, ist aber gegenüber dem Literaturwert für Cyt *c* nur leicht verschoben. Alle Peak- und Formalpotentiale bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s sind in Tabelle 5.1 aufgeführt. Während die kürzeren Thioalkansäuren alle ähnliche Peakpotentiale zeigten und sich ein Formalpotential im Bereich des Literaturwertes [Song *et al.* 1993] ergab, zeigte sich bei MPDA und MHDA eine deutliche Peakseparation. Auch das Formalpotential zeigte eine Abweichung zu positiven Potentialen. Hier ist zu vermuten, dass die Kettenlänge ein Tunneln der Elektronen erschwert und es zu einer kinetischen Limitierung schon bei relativ niedriger Potentialvorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s kommt.

Ebenfalls aufgeführt sind die Ladungsdichten σ_{Ox} und σ_{Red} , die sich aus dem Flächenintegral unter dem jeweiligen Strompeak und der Potentialvorschubgeschwindigkeit errechneten. Der kapazitive Hintergrundstrom wurde zuvor subtrahiert. Eine Abschätzung der Oberflächenbedeckung n mit redoxaktivem Cyt *c* erfolgte durch Bildung des Quotienten aus mittlerer Ladungsdichte σ_m und Elementarladung. Die theoretisch maximale Bedeckung errechnet sich aus dem Quotienten der Elektrodenfläche und der Fläche eines Cyt *c* Moleküls. Aus diesen Werten lässt sich der prozentuale Bedeckungsgrad B_n errechnen.

Tab. 5.1 Elektrochemische Daten für Cyt *c* immobilisiert auf unterschiedlichen SAMs, ermittelt bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s.

SAM	E_{Ox} [mV]	E_{Red} [mV]	E_0 [mV]	σ_{Ox} [$\mu\text{C}/\text{cm}^2$]	σ_{Red} [$\mu\text{C}/\text{cm}^2$]	σ_m [$\mu\text{C}/\text{cm}^2$]	B_n [%]
MPA	14	4	9	0,34	0,24	0,29	18
MHA	2	-2	0	0,68	1,11	0,89	54
MUA	4	-4	0	1,11	1,07	1,09	66
MPDA	136	-49	44	1,01	1,2	1,11	67
MHDA	128	-179	-26	0,92	0,89	0,91	54

Für den Ladungstransfer und den daraus errechneten Bedeckungsgrad mit redoxaktivem Protein ergab sich ein weitestgehend einheitliches Bild. Für alle Monolagen außer für MPA lag der Bedeckungsgrad zwischen 54% und 67%. Die hier ermittelte Bedeckung mit Cyt *c* weicht im Vergleich zur Literatur leicht nach unten ab, so beschrieb [Salomon 2005] einen Bedeckungsgrad von Cyt *c* auf einer SAM aus MUA von 66% bis 81%. Vorhandene Defekte und Passivierungen der Elektrodenoberfläche bzw. SAM bleiben bei der beschriebenen Methode allerdings unberücksichtigt. Ein weiterer Grund für die Abweichung könnten qualitativ unterschiedliche Cyt *c* Chargen sein. So ist bei einem erhöhten Anteil an inaktivem

Cyt c, die Bedeckung mit redoxaktivem Protein geringer. Auffällig ist die niedrige Oberflächenbedeckung mit Cyt c auf MPA. Hier ergab sich nur ein Bedeckungsgrad von 18%. Dieser Wert ist gegenüber den Literaturwerten deutlich reduziert. So untersuchten [Ataka und Heberle 2003] die Oberflächenbedeckung von Cyt c auf MPA mit *Surface Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy* und ermittelten eine Bedeckung von etwa 50%. Eine Erklärung für den niedrigen Wert könnte die Protonierungsreaktion sein, die zum Auftreten des zweiten Peaks führte. Beide Peaks liegen sehr nahe beieinander, sodass eine teilweise Überlagerung nicht ausgeschlossen werden kann. Bei der Integration der Peakströme ergeben sich in diesem Fall niedrigere Werte, die in der Folge zu einem zu geringen Bedeckungsgrad führen. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass MPA aufgrund der Protonierungsreaktion nicht optimal zur Immobilisierung von Cyt c geeignet ist.

Um den Einfluss der Kettenlänge auf die Elektronentransferkinetik zu untersuchen, wurden mit den verschiedenen SAMs und darauf elektrostatisch immobilisiertem Cyt c kinetische Untersuchungen bei Potentialvorschubgeschwindigkeiten zwischen 10 mV/s und 10000 mV/s durchgeführt. Bei niedrigen Potentialvorschubgeschwindigkeiten wurde grundsätzlich ein 5,3 Hz Tiefpassfilter zugeschaltet, um das Hintergrundrauschen zu reduzieren. Um kinetische Beeinflussungen bei höheren Potentialvorschubgeschwindigkeiten auszuschließen, wurde ab einer Scangeschwindigkeit von 500 mV/s auf den Tiefpassfilter verzichtet. Bei den hier auftretenden Strömen war das Hintergrundrauschen zu vernachlässigen. Die Zyklovoltammogramme bei Scangeschwindigkeiten zwischen 200 mV/s und 5000 mV/s sind in Abbildung 5.2 dargestellt. Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied der Peakseparation in Abhängigkeit der Kettenlänge der Moleküle. In allen Fällen kam es zu einer Separation von Oxidations- und Reduktionspeak, die sich bei zunehmender Potentialvorschubgeschwindigkeit vergrößerte. Der Effekt der Peakseparation trat bei kurzkettingen Thioalkansäuren wie MPA und MHA deutlich geringer in Erscheinung, als bei den längerkettingen. Die Peakseparation lässt sich durch den mit der Kettenlänge der SAM zunehmenden Abstand zwischen Elektrode und Redoxzentrum des Proteins erklären und war bereits Gegenstand mehrerer Untersuchungen [Song *et al.* 1993; Feng *et al.* 1997; Avila *et al.* 2000; Niki *et al.* 2002; Wei *et al.* 2004; Yue und Waldeck 2005; Yue *et al.* 2008].

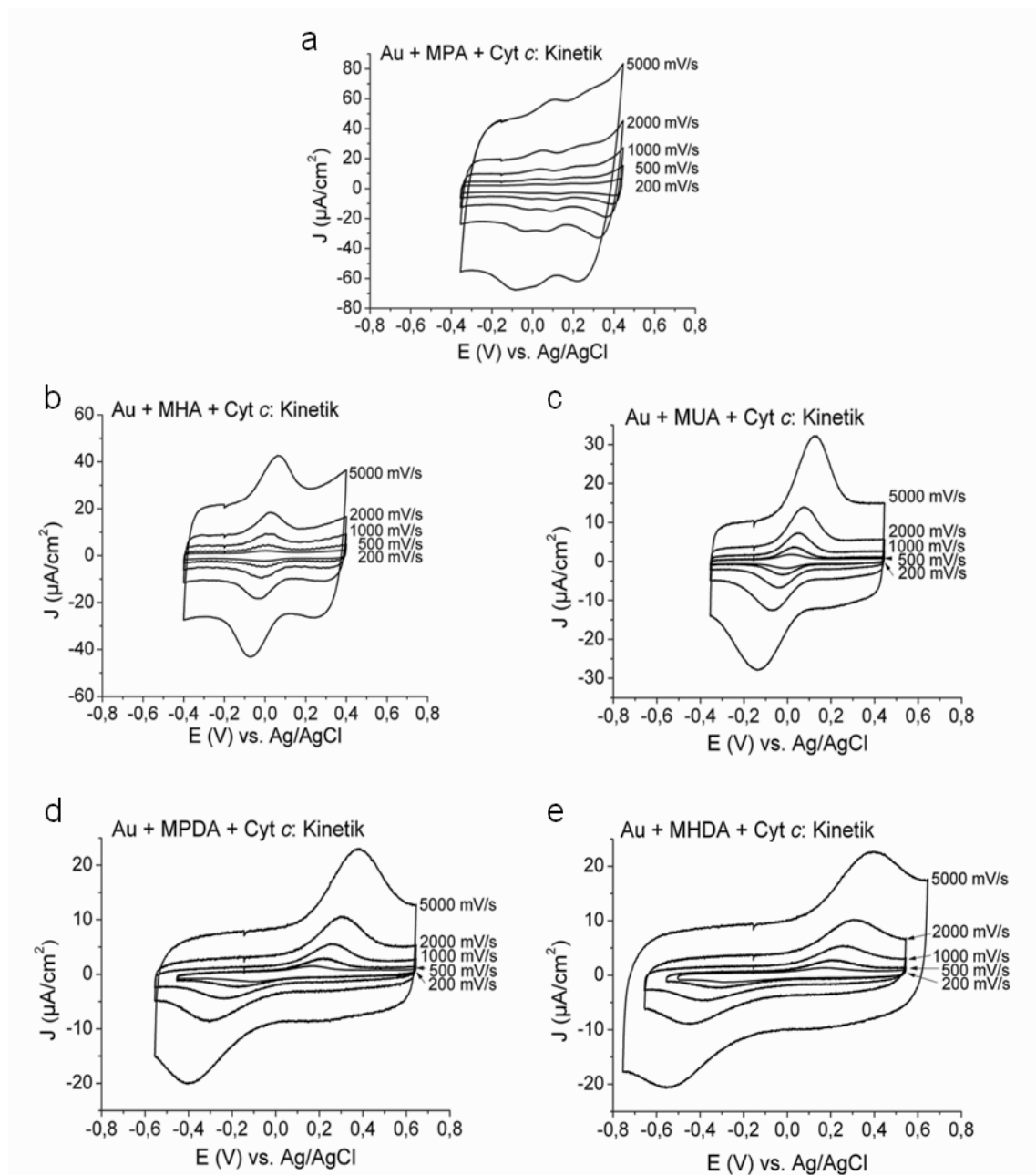


Abb. 5.2 Zyklovoltammogramme von Cyt c, immobilisiert auf MPA (a), MHA (b), MUA (c), MPDA (d), MHDA (e) bei Potentialvorschubgeschwindigkeiten 200 mV/s, 500 mV/s, 1000 mV/s, 2000 mV/s und 5000 mV/s. Als Elektrolyt diente 5,78 mM Phosphatpuffer pH 7,0.

Um die Peakseparation der Versuche miteinander quantitativ vergleichen zu können, wurde die Potentialverschiebung als Funktion der Potentialvorschubgeschwindigkeit aufgetragen. Abbildung 5.3 a zeigt die Darstellung nach [Laviron 1979], in der das Peakpotential E_{Peak} in Abhängigkeit der Scangeschwindigkeit v_{Scan} getrennt für Hin- und Rückreaktion aufgetragen

ist. In Abbildung 5.3 b ist zum besseren Vergleich die Peakpotentialdifferenz ΔE_{Peak} in Abhängigkeit von v_{Scan} dargestellt.

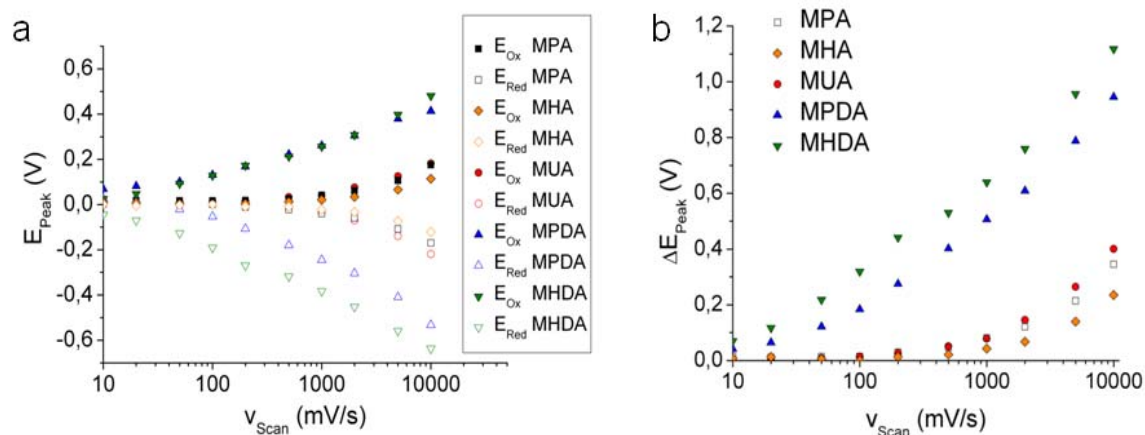


Abb. 5.3 Potentialverschiebung als Funktion der Potentialvorschubgeschwindigkeit nach Laviron (a) und als Peakpotentialdifferenz ΔE_{Peak} in Abhängigkeit von v_{Scan} (b). Gemessen wurde mit Potentialvorschubgeschwindigkeiten zwischen 10 mV/s und 10000 mV/s.

Deutlich zu erkennen ist, dass die Peakseparation für kurzkettige Thioalkansäuren kleiner ist und mit steigender Kohlenstoffanzahl in der Molekülkette zunimmt. Einzige Ausnahme stellt MPA dar. Hier ergab sich eine höhere Peakseparation als für MHA, obwohl aufgrund der Kettenlänge eigentlich eine geringere Separation zu erwarten gewesen wäre. Da bei MPA die Protonierungsreaktion auftrat, die zu den erwähnten Doppelpeaks führte, und gerade bei höheren Vorschubgeschwindigkeiten beide Peaks miteinander verschmolzen (Abb. 5.2 a), war die Bestimmung des tatsächlichen Peakpotentials erschwert. Zudem ist bekannt, dass kurzkettige Moleküle weniger geordnet sind als langkettige. Aus diesem Grund kann bei Molekülen wie MPA von einer größeren Anzahl Defekte in der SAM ausgegangen werden, die den Ladungstransfer ebenfalls beeinflussen. Zur quantitativen Analyse wurden aus den Messdaten Durchtrittsfaktor α und Standardgeschwindigkeitskonstante für den Elektronentransfer k_0 berechnet. Als Berechnungsgrundlage diente die Laviron-Gleichung, die aus der Butler-Volmer Gleichung abgeleitet wurde [Laviron 1978]. Unter Annahme eines kinetisch kontrollierten, irreversiblen Redoxsystems ergibt sich eine lineare Abhängigkeit der Peakpotentiale von dem Logarithmus der Potentialvorschubgeschwindigkeit. Nach Laviron kann ein irreversibles System für $\Delta E_{Peak} > 200/n$ mV (n = Anzahl der beteiligten Elektronen) angenommen werden:

$$E_{Ox} = E_0 + \frac{2,3RT}{(1-\alpha)nF} \log \frac{(1-\alpha)nv_{Scan}F}{RTk_0} \quad (5.1)$$

$$E_{Red} = E_0 - \frac{2,3RT}{\alpha nF} \log \frac{\alpha nv_{Scan}F}{RTk_0} \quad (5.2)$$

R = Gaskonstante [J/mol·K]; T = Temperatur [K]; F = Faraday-Konstante [C/mol]

Der Durchtrittsfaktor α wurde aus der Steigung, der durch die Messpunkte des Laviron Graphen gefitteten Gerade, berechnet. Dabei ist darauf zu achten, dass die Gerade nur durch Messpunkte gelegt wird, bei denen sich eine Potentialdifferenz $\Delta E_{Peak} > 200$ mV ergibt. Für die Steigung der Geraden gilt für den anodischen Scan:

$$m = -\frac{2,3RT}{\alpha nF} \quad (5.3)$$

und für den kathodischen Scan:

$$m = \frac{2,3RT}{(1-\alpha)nF} \quad (5.4)$$

Mit den so errechneten Werten für den Durchtrittsfaktor α wurde anschließend die entsprechende Standardgeschwindigkeitskonstante k_0 mit Hilfe der folgenden Formel und den aus dem Laviron Diagramm bestimmten Achsenabschnitten b_{Ox} und b_{Red} berechnet:

$$b_{Ox} = E_0 + \frac{2,3RT}{(1-\alpha)nF} \log \frac{(1-\alpha)nF}{RTk_0} \quad (5.5)$$

$$b_{Red} = E_0 - \frac{2,3RT}{\alpha nF} \log \frac{\alpha nF}{RTk_0} \quad (5.6)$$

Die für die unterschiedlichen SAMs errechneten Durchtrittsfaktoren und Standardgeschwindigkeitskonstanten sind in Tabelle 5.2 zusammengestellt.

Tab. 5.2 Nach Laviron errechnete Werte für Durchtrittsfaktor α und Standardgeschwindigkeitskonstante k_0 .

SAM	α	k_0 [s ⁻¹]	Log k_0
MPA	0,515	17,1	1,2
MHA	0,500	26,5	1,4
MUA	0,453	13,2	1,1
MPDA	0,422	0,5	-0,7
MHDA	0,470	0,3	-0,4

Für α ergaben sich sehr konsistente Werte. Der Durchtrittsfaktor bestimmt die Symmetrie der Strom-Spannungskurven, weshalb α auch als Symmetriekoeffizient bezeichnet wird [Schmickler 1996] und zwischen 0 und 1 liegt. Für eine vollständig symmetrische Elektronentransferreaktion sollte α bei 0,5 liegen. Für alle Messungen wurden Werte in diesem Bereich errechnet, wodurch die Bedingungen für einen symmetrischen Elektronentransfer erfüllt sind. Bei kurzkettigen Thioalkansäuren ($n_{\text{C-Atome}} < 11$) ergaben sich für k_0 ähnliche Werte. Diese nahmen für länger-kettige Moleküle ($n_{\text{C-Atome}} \geq 11$) deutlich und logarithmisch ab. Abbildung 5.4 zeigt graphisch den Zusammenhang zwischen k_0 und Anzahl der Kohlenstoffatome in der SAM. Hierzu wurde der Log k_0 gegenüber $n_{\text{C-Atome}}$ aufgetragen.

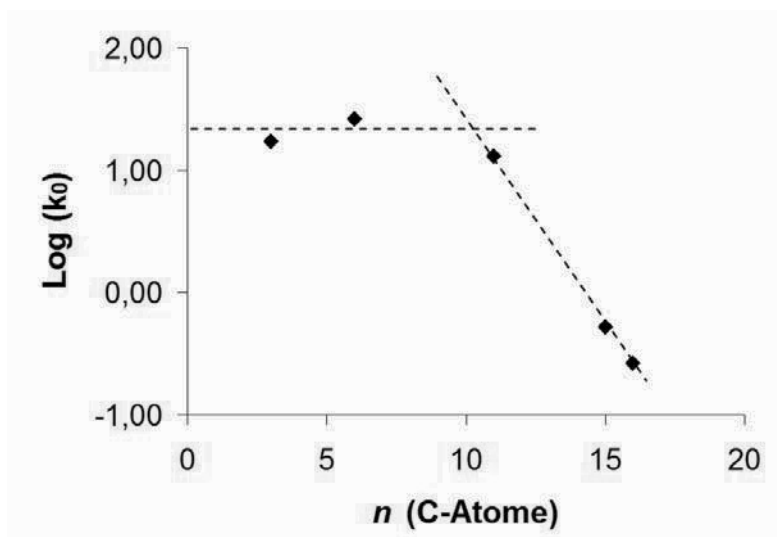


Abb. 5.4 Logarithmische Darstellung der ermittelten Standardgeschwindigkeitskonstanten k_0 als Funktion der Anzahl von C-Atomen $n_{\text{C-Atome}}$ in der Thioalkansäure SAM. Unterbrochene Linien illustrieren den linearen Zusammenhang zwischen Log k_0 und $n_{\text{C-Atome}}$, für $n_{\text{C-Atome}} \geq 11$ und den Sättigungseffekt bei kurzkettigen SAMs.

Es ist bekannt, dass bei Alkanthiolen das Tunnelverhalten exponentiell von der Molekülkettenlänge abhängt (vergleiche Kapitel 2.4). Dem widerspricht die Tatsache, dass sich die Standardgeschwindigkeitskonstante bei sehr kurzkettingen Molekülen nicht weiter exponentiell steigern lässt. Dieser Effekt war Gegenstand umfangreicher Untersuchungen und wird in der Literatur beschrieben [Feng *et al.* 1997; Avila *et al.* 2000; Murgida und Hildebrandt 2001; Niki *et al.* 2002]. Während für kurzkettinge Moleküle mit weniger als 10 Methylgruppen ein relativ konstanter maximaler Wert beschrieben wird, ergibt sich für Moleküle mit 10 bis 17 Methylgruppen ein exponentieller Zusammenhang, wobei $\log k_0$ mit einem Wert von 1,09 pro Methylgruppe abnimmt [Feng *et al.* 1997]. Die Erklärung hierfür ergibt sich aus der Annahme einer, der eigentlichen Elektronentransferreaktion vorgelagerten, Reorientierungsreaktion von Cyt c. Nach [Avila *et al.* 2000] kann der Elektronentransferprozess zwischen Elektrode und Redoxzentrum von Cyt c in drei Schritte unterteilt werden. [Avila *et al.* 2000] unterscheiden zwischen dem intramolekularen Elektronentransfer zwischen Häm-Gruppe und Bindestelle von Cyt c, sowie dem intermolekularen Elektronentransferprozess an der Grenzfläche zwischen Cyt c und Carboxylterminus der SAM. Der dritte Schritt besteht aus dem Tunnelprozess durch die SAM. Letzterer wird allgemein für die Abnahme der Geschwindigkeitskonstante bei zunehmender Kettenlänge der SAM verantwortlich gemacht [Xu *et al.* 1993; Feng *et al.* 1997], da bei zunehmender Distanz zwischen Elektrode und Cyt c der Tunnelprozess erschwert wird. Auch der intramolekulare Elektronentransfer wurde bereits studiert [Winkler und Gray 1992], gibt jedoch keine schlüssige Erklärung für die beobachteten ähnlichen Geschwindigkeitskonstanten. [Avila *et al.* 2000] konzentrierten sich bei ihren Untersuchungen auf den intermolekularen Elektronentransfer. Sie stellten die These auf, dass es nach der stabilen elektrostatischen Bindung des Proteins an die SAM zu einer Umlagerung des Proteins kommt, die zu einer Neuordnung führt und den Ladungstransfer erst ermöglicht [Avila *et al.* 2000]. Dieser als Gating-Prozess bezeichnete Schritt ist geschwindigkeitslimitierend und führt dazu, dass die Geschwindigkeitskonstante selbst für sehr kurzkettinge SAM Moleküle einen bestimmten Wert nicht überschreitet. Ähnliche konformative Reorganisationen, die einem Elektronentransfer vorausgehen, sind auch von anderen Redoxproteinen bekannt [Jeuken 2003]. Der Gating-Effekt bei Cyt c wurde von [Murgida und Hildebrandt 2001] näher untersucht. Mit Hilfe von *Surface Enhanced Resonance Raman Spectroscopy* zeigten sie, dass die Orientierung von elektrostatisch immobilisiertem Cyt c linear von dem Elektrodenpotential und exponentiell von der Kettenlänge der Thioalkansäure abhängt. Sie bestätigten, dass die Redoxreaktion, aufgrund

des sich ändernden Elektrodenpotentials, von einer Reorientierung des Cyt c auf der Elektrodenoberfläche begleitet wird, wobei erst nach der Neuausrichtung des Proteins ein Elektronentransfer stattfinden kann. Auf langkettigen SAM Molekülen erfolgt die Umlagerung von Cyt c innerhalb einer Millisekunde, wohingegen der Elektronentransfer Sekunden in Anspruch nimmt. Im Gegensatz dazu erfolgen Reorientierung und Elektronentransfer bei kurzkettigen SAM Molekülen innerhalb vergleichbarer Zeitspannen. Bei sehr kurzen Abständen zwischen Elektrode und Protein ist die Umlagerungsreaktion limitierend für den Elektronentransfer.

Aus Abbildung 5.4 geht hervor, dass die exponentielle Abnahme der Standardgeschwindigkeitskonstanten bei längerkettigen SAM Molekülen bei den hier durchgeführten Experimenten weniger stark ausgeprägt ist, als in der Literatur beschrieben. So ergibt sich für die Abnahme von $\log k_0$ nur ein Wert von -0,35 pro Methylgruppe. Darüber hinaus liegen die k_0 Werte deutlich niedriger als Vergleichswerte der Literatur. Während die maximal erreichten Literaturwerte von $\log k_0$ für kurzkettige Thioalkansäuren wie MPA mit etwa 3 bis 3,5 angegeben wurden [Feng *et al.* 1997; Niki *et al.* 2002], liegen sie hier nur bei etwa 1,4. Die Ursache für diese Verschiebung der k_0 Werte konnte nicht abschließend geklärt werden. Unterschiedliche Untersuchungen, die unabhängig voneinander an unserem Institut erfolgten, erbrachten jedoch vollkommen konsistente Ergebnisse. In allen Fällen lagen die Standardgeschwindigkeitskonstanten deutlich unter den Literaturwerten. Die Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert S_{xm} lag bei den durchgeführten Vergleichsmessungen in der Regel unter 10%.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass kurzkettige Thioalkansäuren mit $n_{C-Atome} \leq 11$ aufgrund ihrer schnellen Kinetik besonders zur Immobilisierung von Cyt c geeignet sind. Die auftretenden Protonierungsreaktionen erschweren die quantitative Analyse der Messdaten, insbesondere bei MPA. Die besten Ergebnisse, insbesondere im Hinblick auf eine hohe Oberflächenbedeckung, wurden bei den kurzkettigen Thioalkansäuren mit MUA erzielt. Dieses Molekül eignet sich sehr gut für die elektrostatische Immobilisierung von Cyt c.

Mercaptobenzoessäure

Neben aliphatischen Thioalkansäuren kommen für die elektrostatische Immobilisierung von Cyt *c* auch aromatische Moleküle in Betracht. Diese sollten sich aufgrund ihrer guten Elektronentransfereigenschaften besonders für den Ladungstransfer zwischen Elektrode und Redoxprotein eignen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Mercaptobenzoessäure (MBA) als aromatische Verbindung zur Immobilisierung von Cyt *c* verwendet und die sich im Vergleich zu MUA ergebenden Redox Eigenschaften von Cyt *c* untersucht. In früheren Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass MBA auf zweidimensionalen Goldelektroden homogene Monolagen ausbildet und Cyt *c*-Bedeckungen vergleichbar zu MUA erzielt werden können [Salomon 2005]. Von MBA existieren drei Konstitutionsisomere, wobei die Carboxylgruppe in *orto*- (2-MBA), *meta*- (3-MBA) oder *para*-Stellung (4-MBA) angeordnet sein kann. Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Stellung der Carboxylgruppe auf Proteinimmobilisierung und Elektronentransfer hat, wurden alle 3 Isomere zur Immobilisierung verwendet und das Redoxverhalten von Cyt *c* mittels Zyklovoltammetrie bei einer Potentialvorschubgeschwindigkeit von 50 mV/s aufgezeichnet (Abbildung 5.5 a-c). Abbildung 5.5 d illustriert schematisch die elektrostatische Immobilisierung von Cyt *c* auf 4-MBA.

Die Untersuchungen ergaben für Cyt *c*, immobilisiert auf 3-MBA und 4-MBA, sehr vergleichbare Redox Eigenschaften. In beiden Fällen ist ein deutlicher Redoxpeak mit einem Formalpotential von 18 mV für 3-MBA und für 4-MBA zu erkennen. Die Peaks sind kleiner als bei den untersuchten Thioalkansäuren. Ein abweichendes Verhalten zeigte sich für 2-MBA. Hier ist kein Redoxpeak zu erkennen. Es kann daher geschlussfolgert werden, dass es aufgrund der *orto*-Stellung der Carboxylgruppe zu sterischen Behinderungen kam, die eine elektrostatische Immobilisierung von Cyt *c* nicht zuließen. 2-MBA eignet sich somit nicht für die Immobilisierung von Redoxproteinen. Aus den Flächenintegralen der Peakströme von 3-MBA und 4-MBA wurden die Ladungsstromdichten und der Bedeckungsgrad analog zu den Thioalkansäuren berechnet. Tabelle 5.3 zeigt die elektrochemischen Daten im Vergleich zu MUA.

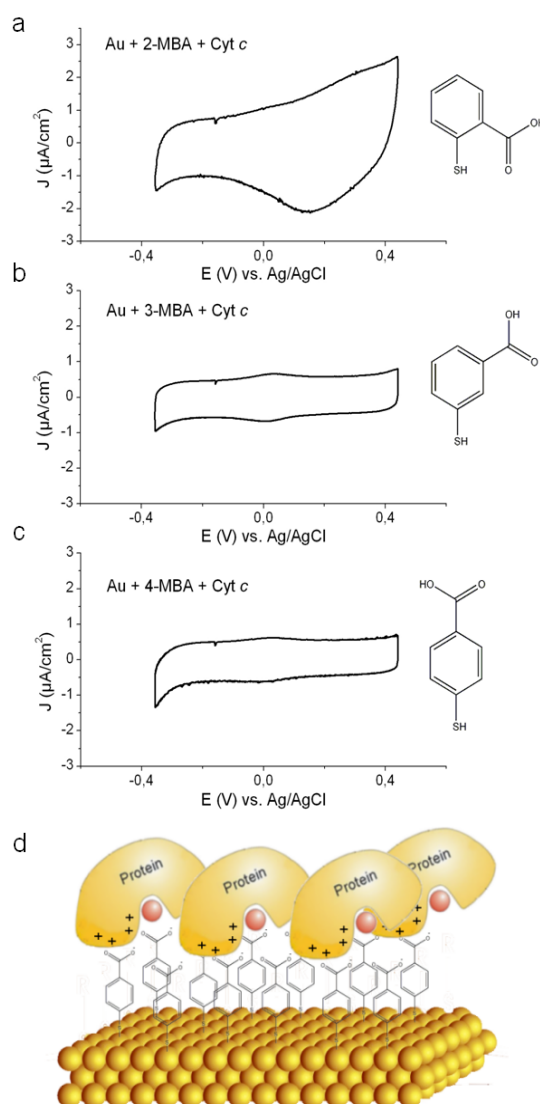


Abb. 5.5 Zyklovoltammogramme von Cyt c immobilisiert auf 2-MBA (a), 3-MBA (b) und 4-MBA in Phosphatpuffer ($I = 5,78$ mM, pH 7,0), bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 50 mV/s. Die Potentiale sind bezogen auf das Potential einer Ag/AgCl Referenzelektrode (3M KCl), als Gegenelektrode diente ein Platindraht. (d) Schematische Zeichnung der elektrostatischen Immobilisierung von Cyt c auf einer SAM aus 4-MBA.

Tab. 5.3 Elektrochemische Daten für Cyt c immobilisiert auf unterschiedlichen SAMs, ermittelt bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 50 mV/s bzw. 100 mV/s für MUA.

SAM	E_{Ox} [mV]	E_{Red} [mV]	E_0 [mV]	σ_{Ox} [$\mu\text{C}/\text{cm}^2$]	σ_{Red} [$\mu\text{C}/\text{cm}^2$]	σ_m [$\mu\text{C}/\text{cm}^2$]	B_n [%]
3-MBA	31	5	18	0,41	0,43	0,42	25
4-MBA	24	11	18	0,3	0,3	0,3	18
MUA	4	-4	0	1,11	1,07	1,09	66

Die Peakpotentiale zeigen nur eine geringe Separation und das Formalpotential ist mit 18 mV im Vergleich zum Literaturwert von Cyt c geringfügig zu positiven Potentialen verschoben. Derartig geringe Potentialverschiebungen können unterschiedliche Ursachen haben. Neben einer geringen pH-Abweichung des Puffers können auch das Alter und der Zustand der verwendeten Referenzelektrode und Temperatureinflüsse das Potential im Bereich von einigen mV verschieben. Ein sehr konsistentes Bild ergab sich für die errechneten Ladungsdichten, die für Oxidations- und Reduktionspeak in beiden Fällen identisch sind. Die Ladungsdichte für Cyt c auf 4-MBA ist etwas geringer als die für 3-MBA, beide Ladungsdichten sind jedoch deutlich geringer als der Vergleichswert für MUA. Entsprechend errechnet sich ein geringerer Bedeckungsgrad mit redoxaktivem Cyt c im Vergleich zu MUA. Eine Erklärung für die geringe Bedeckung könnte eine nicht vollkommen homogene SAM sein, aufgrund schlechter Selbstorganisationseigenschaften im Vergleich zu MUA. In diesem Fall wäre es zu einer nur unvollständigen Oberflächenbedeckung mit Cyt c gekommen.

Auch mit elektrostatisch auf 3-MBA und 4-MBA immobilisiertem Cyt c wurden kinetische Untersuchungen analog zu den Thioalkansäuren durchgeführt. Die Zyklovoltammogramme, bei unterschiedlichen Potentialvorschubgeschwindigkeiten zwischen 200 mV/s und 5000 mV/s, sind in Abbildung 5.6 gezeigt.

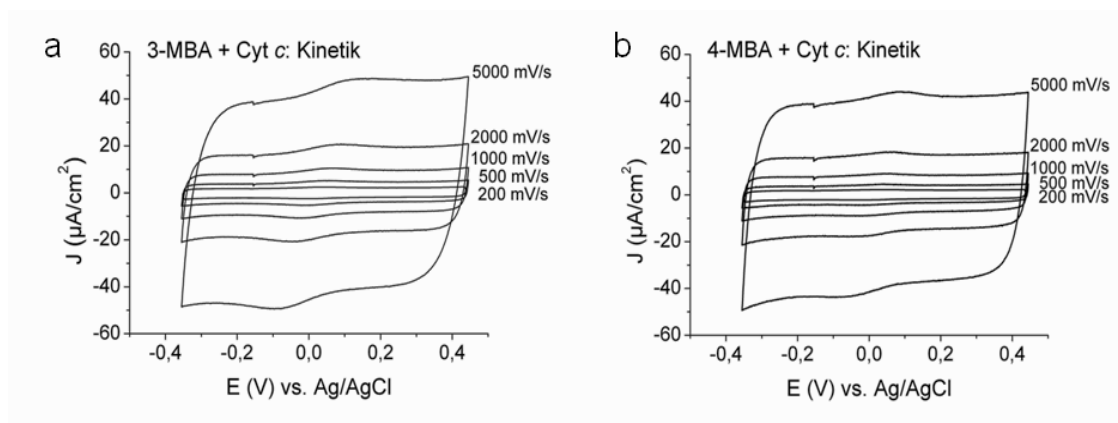


Abb. 5.6 Zyklovoltammogramme von Cyt c immobilisiert auf 3-MBA (a) und 4-MBA (b) bei Potentialvorschubgeschwindigkeiten 200 mV/s, 500 mV/s, 1000 mV/s, 2000 mV/s und 5000 mV/s. Als Elektrolyt diente 5,78 mM Phosphatpuffer pH 7,0.

Für beide SAMs zeigte sich ein ähnliches kinetisches Verhalten. Die Peakseparation war in beiden Fällen gering. Zur besseren Veranschaulichung und zum Vergleich mit MUA wurden

die Peakpotentiale des Hin- und Rückscans (Abbildung 5.7 a) bzw. die Peakpotentialdifferenzen ΔE_{Peak} (Abbildung 5.7 b) in Abhängigkeit der Scangeschwindigkeit aufgetragen.

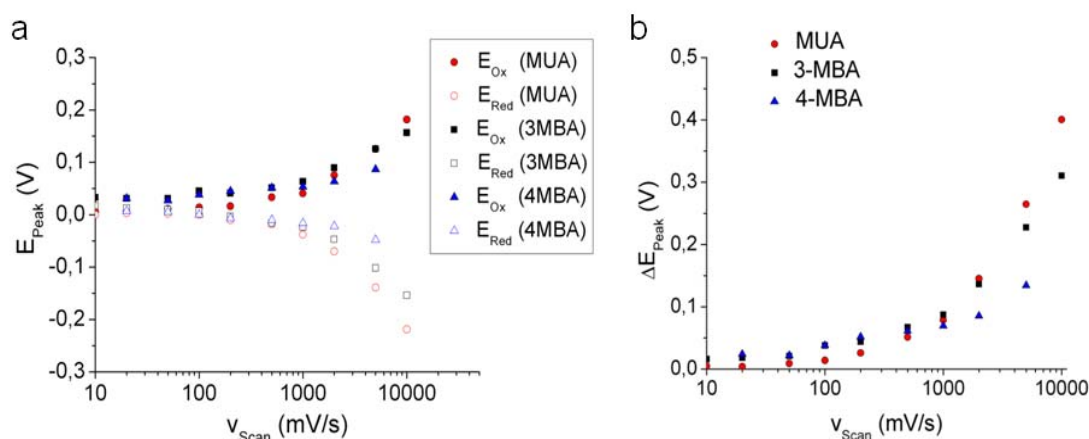


Abb. 5.7 Potentialverschiebung als Funktion der Potentialvorschubgeschwindigkeit nach Laviron (a) und als Peakpotentialdifferenz ΔE_{Peak} in Abhängigkeit von v_{Scan} (b). Gemessen wurde mit Potentialvorschubgeschwindigkeiten zwischen 10 mV/s und 10000 mV/s (5000 mV/s für 4-MBA).

Für 4-MBA ergab sich bei Scangeschwindigkeiten über 1000 mV/s eine deutlich geringere Peakseparation als für MUA. Die Peakseparation von 3-MBA hingegen war größer als die von 4-MBA und wurde erst bei Scangeschwindigkeiten ab 5000 mV/s geringer als bei MUA. Offenbar kam es bei 3-MBA zu einer kinetischen Behinderung des Ladungstransfers, der bei 4-MBA in dieser Form nicht auftrat. Grund hierfür könnte die Stellung der Carboxylgruppe sein, die eine nicht so optimale Orientierung des immobilisierten Proteins zur Folge hat und damit zu einer größeren Distanz zwischen Elektrodenoberfläche und Häm-Gruppe führt.

Analog zu den Thioalkansäuren wurden Durchtrittsfaktor α und Standardgeschwindigkeitskonstante k_0 berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.4 zusammengestellt.

Tab. 5.4 Nach Laviron errechnete Werte für Durchtrittsfaktor α und Standardgeschwindigkeitskonstante k_0 von Cyt c für 3-MBA und 4-MBA als SAM im Vergleich zu MUA.

SAM	α	k_0 [s ⁻¹]	Log k_0
3-MBA	0,385	12,1	1,08
4-MBA	0,442	15,3	1,18
MUA	0,453	13,2	1,10

Der errechnete Durchtrittsfaktor für 4-MBA liegt mit 0,442 sehr nahe an 0,5 und deutet auf ein symmetrisches Redoxverhalten hin. Bei 3-MBA ist der Wert mit 0,385 deutlich geringer.

Um die Standardgeschwindigkeitskonstanten in Relation zu den gemessenen Geschwindigkeitskonstanten der Thioalkansäuren zu betrachten, wurden die $\text{Log } k_0$ Werte gegenüber der Anzahl der am Elektronentransfer beteiligten Kohlenstoffatome $n_{\text{C-Atome}}$ aufgetragen (Abbildung 5.8). MBA besteht zwar aus insgesamt 7 Kohlenstoffatomen, bei dem Elektronentransfer zwischen Thiol- und Carboxylgruppe sind jedoch nur 4 (3-MBA) bzw. 5 (4-MBA) Kohlenstoffatome zu überwinden.

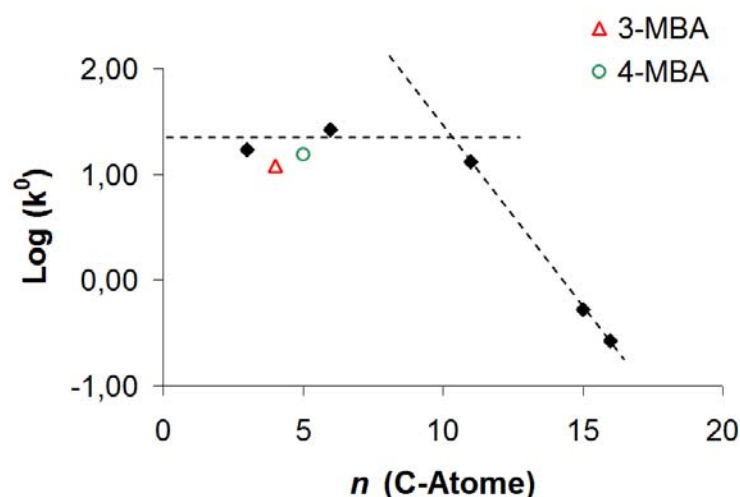


Abb. 5.8 Logarithmische Darstellung der ermittelten Standardgeschwindigkeitskonstanten k_0 als Funktion der Anzahl von C-Atomen $n_{\text{C-Atome}}$ in der Thioalkansäure SAM (schwarze Punkte). Als rotes Dreieck eingezeichnet ist der $\text{Log } k_0$ Wert für 3-MBA, als grüner Kreis der für 4-MBA. Unterbrochene Linien illustrieren den linearen Zusammenhang für $n_{\text{C-Atome}} \geq 11$ und den Sättigungseffekt bei kurzkettigen SAMs.

Die Standardgeschwindigkeitskonstanten für 3-MBA und 4-MBA liegen sehr nahe beieinander und zudem in dem Bereich der Geschwindigkeitskonstanten kurzkettiger Thioalkansäuren. Die trotz unterschiedlicher Anzahl an Kettengliedern und der unterschiedlichen elektronischen Eigenschaften vergleichbaren Geschwindigkeitskonstanten deuten darauf hin, dass sich beide Moleküle wie kurzkettige Thioalkansäuren verhalten. Auch hier kam es, trotz guter Elektronentransfereigenschaften, aufgrund des beschriebenen Gating-Prozesses, zu keinen erhöhten Elektronentransferraten. 3-MBA und 4-MBA eignen sich grundsätzlich zur Immobilisierung von Cyt c, wobei sowohl hier als auch in der Literatur geringere Oberflächenbedeckungen mit Cyt c erzielt werden konnten.

Gemischte Monolagen

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass Cyt c effizient an carboxylterminierte Thioalkane bindet und ein gutes Redoxverhalten zeigt. Durch Veränderung der Kettenlänge kann in begrenztem Maße Einfluss auf den Elektronentransfer genommen werden, wobei die Orientierung des Redoxproteins eine entscheidende Rolle spielt. Eine Kontrolle der Orientierung auf der Elektrodenoberfläche wäre somit ein wirksames Instrument zur Optimierung des Elektronentransfers. Durch Verwendung einer gemischten Monolage als SAM, lässt sich die Orientierung von Cyt c an der Elektrodenoberfläche beeinflussen [Imabayashi *et al.* 2005; Yue *et al.* 2008]. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich auf einer gemischten Monolage mit Ethylenglykol Einheiten (EG) eine effizientere Immobilisierung und Orientierung von Cyt c erzielen lässt und wie sich das auf die Elektronentransfereigenschaften auswirkt. EG Einheiten erlauben aufgrund ihrer Struktur eine flexible Oberflächenanbindung in wässriger Umgebung, wodurch die Proteinimmobilisierung begünstigt sein sollte. Des Weiteren unterdrücken die EG Einheiten die Denaturierung von Proteinen an der Elektrodenoberfläche und verhindern unspezifische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen [Rusmini *et al.* 2007; Pale-Grosdemange *et al.* 1991]. Hierdurch kann eine Verunreinigung durch Adsorption anderer Proteine ausgeschlossen werden. EG basierende Monolagen sind somit von besonderem Interesse für die Bioelektronik, wenn es um die spezifische Immobilisierung von Proteinen geht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Au(111) Elektroden mit carboxylterminierten SAMs beschichtet, die EG Einheiten enthielten und das Adsorptions- und Redoxverhalten von Cyt c charakterisiert. Als Vergleich diente die elektrostatische Immobilisierung von Cyt c auf MUA. Die gemischten Monolagen bestanden aus MUA und SPT12. SPT12 wurde von der Firma SensoPath Technologies Inc. (Bozeman, MT, USA) synthetisiert und enthält eine endständige Carboxylgruppe, eine weitere endständige Thiolgruppe und eine EG Einheit zwischen Alkylkette und Carboxylgruppe (siehe Kapitel 3.6.2). Das Verhältnis an EG Einheiten innerhalb der SAM wurde durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse von MUA und SPT12 kontrolliert.

Ein häufiges Problem bei der Herstellung von gemischten Monolagen ist das Auftreten einer inhomogenen Bedeckung. Dabei unterscheidet man zwei Ursachen. Häufig kommt es zur Phasenseparation an der Oberfläche und zur Ausbildung von Domänen mit nur einem der Moleküle [Hobara *et al.* 1999]. Des Weiteren führen unterschiedliche Adsorptionskoeffizienten der beteiligten Molekülspezies ebenfalls zu einer inhomogenen Bedeckung. Um

eine solche inhomogene Bedeckung bei gemischten Monolagen aus MUA und SPT12 auszuschließen, wurden elektrochemische Desorptionsmessungen unter alkalischen Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurde das Potential soweit abgesenkt, bis es zur Elektrodessorption der auf der Elektrodenoberfläche befindlichen Moleküle kam. Bei einer inhomogenen Bedeckung desorbieren beide Komponenten bei unterschiedlichen Potentialen, was zur Ausbildung zweier Desorptionspeaks führt, die jeweils nahe am Desorptionspotential der Einzelkomponenten liegen [Hobara *et al.* 1998; Imabayashi *et al.* 2001]. Eine homogene Bedeckung führt hingegen zur Ausbildung eines einzigen Desorptionspeaks [Imabayashi *et al.* 2001]. Die Zyklovoltammogramme, bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von MUA/SPT12, sind in Abbildung 5.9 gezeigt.

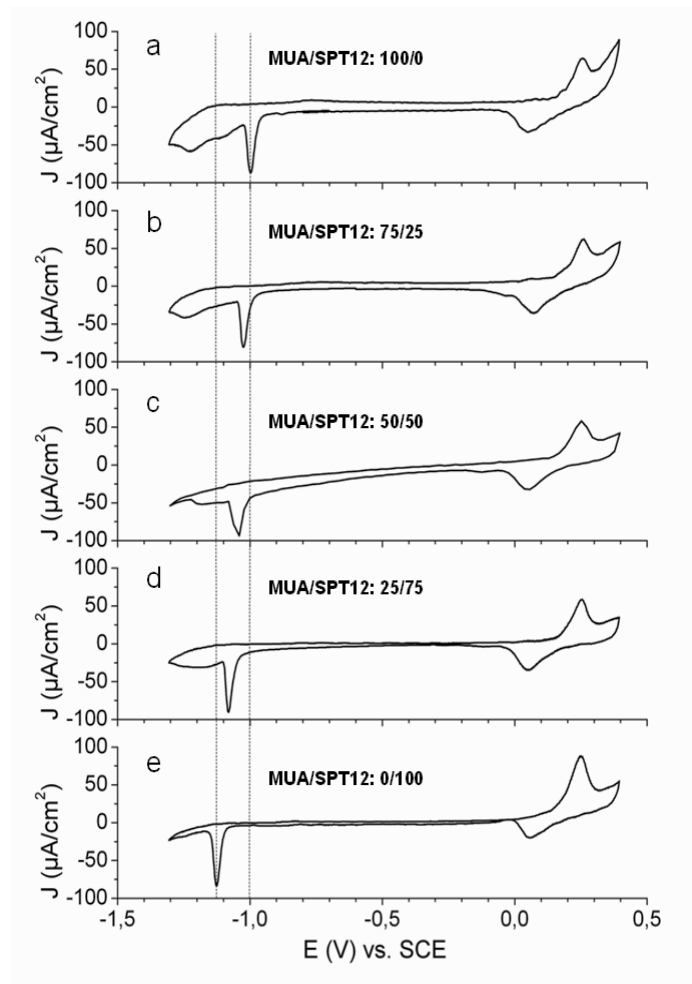


Abb. 5.9 Reduktive Desorption von SAMs mit unterschiedlichen Zusammensetzungen aus MUA und SPT12, angegeben sind die prozentualen Stoffmengenverhältnisse: (a) 100% MUA; (b) 75% MUA, 25% SPT12; (c) 50% MUA, 50% SPT12; (d) 25% MUA, 75% SPT12; (e) 100% SPT12. Alle Messungen erfolgten unter Argon Atmosphäre in 0,5 M KOH bei 50 mV/s. Die Potentiale sind gegen eine Standard Calomel Elektrode (SCE) gemessen.

In allen Messungen ergab sich ein einheitliches Peakpotential für die Au Reduktion von etwa 50 mV. Es wurden keine Potentialverschiebungen beobachtet, sodass abweichende Desorptionspotentiale ausschließlich auf die gemischte Monolage zurückzuführen sind. Die Desorptionspeaks der SAMs MUA/SPT12 (100/0) und (0/100) lagen bei einem Potential von -95 mV bzw. -115 mV (Abbildung 5.9 a und e). Die Differenz in den Peakpotentialen ergibt sich aus dem Unterschied der Gibbs Energie, bei der Adsorption der Thiole auf der Goldoberfläche [Imabayashi *et al.* 1997] und zeigt, dass die SPT12 SAM auf Gold stabiler ist, als die kürzerkettige MUA SAM. Für gemischte Monolagen wurde jeweils nur ein Desorptionspeak beobachtet, dessen Potential zwischen den Desorptionspotentialen der Einzelmonolagen aus SPT12 bzw. MUA lag und sich in Abhängigkeit der Monalagenzusammensetzung veränderte. Ein einziger Desorptionspeak lässt erkennen, dass es zu einer homogenen Verteilung der co-adsorbierten Spezies in der SAM ohne Phasenseparation kam. Die lineare Abhängigkeit deutet auf eine Mischung der SAM entsprechend dem Molenbruch der Lösung hin. Abbildung 5.10 zeigt diese Abhängigkeit der Desorptionspotentiale von der Monolagenzusammensetzung. Des Weiteren ist auf der zweiten y-Achse die relative Desorptions-Peakfläche (bezogen auf die Peakfläche der Au Reduktion) als Maß für die Monolagenbedeckung aufgetragen.

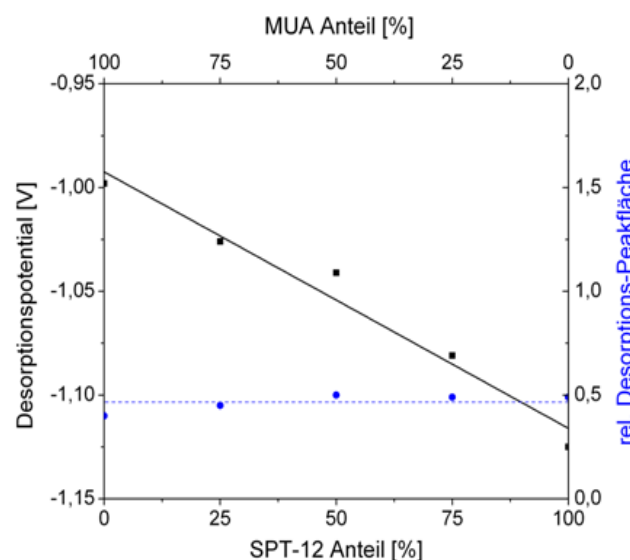


Abb. 5.10 Desorptionspotential und relative Desorptions-Peakfläche als Funktion der prozentualen Monolagenzusammensetzung.

Aus dem Diagramm wird ersichtlich, dass die relative Desorptions-Peakfläche für alle Messungen annähernd konstant ist. Es kann somit für MUA und SPT12 von ähnlichen

Adsorptionskoeffizienten und einer bei allen Monolagenzusammensetzungen konstanten Anzahl adsorbierter Moleküle ausgegangen werden. In der Literatur finden sich vergleichbare Untersuchungen mit anderen homogenen gemischten Monolagen [Kim *et al.* 2006]. Dabei zeigte sich eine ähnliche Abhängigkeit der Desorptionspotentiale von der Monolagenzusammensetzung, wobei sich jedoch keine lineare Beziehung ergab. Aufgrund der homogenen Struktur der gemischten Monolage aus MUA und SPT12 kann davon ausgegangen werden, dass Cyt c ebenfalls homogen bindet.

Um die elektrostatische Adsorption von Cyt c bei unterschiedlichen Monolagenzusammensetzungen zu untersuchen, wurden SPR Messungen durchgeführt. Es kamen jeweils 10 μM Cyt c Konzentrationen zum Einsatz. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.11 gezeigt.

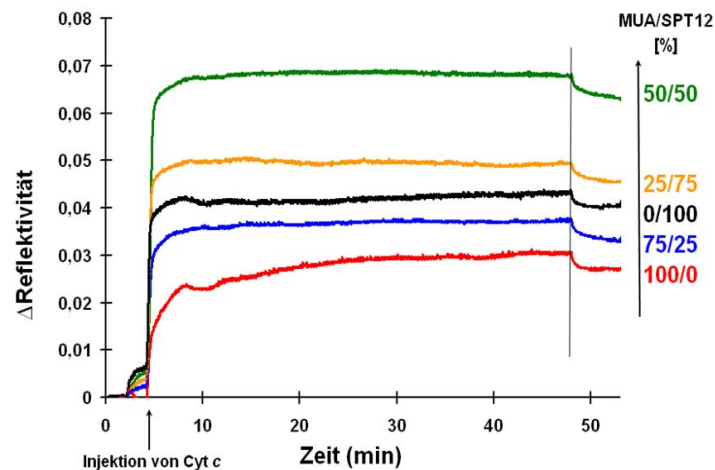


Abb. 5.11 SPR Messung der Adsorption von Cyt c an Monolagen mit unterschiedlichen Anteilen von MUA und SPT12. Gemessen wurde die Reflektivitätsänderung in Abhängigkeit der Zeit. Die Injektion der Proteinlösung ist gekennzeichnet. Nach etwa 47 min wurde die Proteinlösung gegen Pufferlösung ausgetauscht.

Die Immobilisierung von Cyt c erfolgte auf allen SAMs innerhalb weniger Minuten nach Zugabe und folgte dem Langmuirschen Adsorptionsmodell [Adamson 1990]. Nach Erreichen eines konstanten Wertes wurde mit 5,78 mM Phosphatpuffer pH 7,0 gespült, um unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen. Hierbei kam es zu einer nur geringen Desorption, was auf eine effiziente und unter diesen Bedingungen irreversible Immobilisierung des Cyt c schließen lässt. Für Systeme, die nur mit MUA beschichtet wurden, zeigte sich das schlechteste Adsorptionsverhalten. Für eine Monolage, die nur aus SPT12 bestand, ergab sich eine deutlich höhere Bedeckung und eine schnellere

Bindungskinetik. Die effizienteste Adsorption erfolgte bei einer gemischten Monolage mit gleichen Anteilen aus MUA und SPT12. Die relative Bedeckung mit Cyt c war im Vergleich zu reinem MUA um Faktor 2,3 und im Vergleich zu reinem SPR12 um Faktor 1,6 erhöht. Da sich bei der reduktiven Desorption keine signifikanten Unterschiede bei der Anzahl der adsorbierten Thiolverbindungen auf dem Substrat ergaben, kann von einer konstanten Bedeckung mit Carboxylgruppen ausgegangen werden. Alkanthiole weisen eine hohe Packungsdichte auf und bilden relativ starre Monolagen aus. Die EG Einheiten hingegen sind weniger perfekt geordnet. Aufgrund der dadurch auftretenden Flexibilität der Carboxylgruppen, können mehr Cyt c Moleküle an der Oberfläche gebunden werden, als auf der starren MUA SAM. Die Flexibilität der Carboxylgruppen hängt jedoch von dem Abstand der EG Einheiten untereinander ab. Im Falle der ausschließlich mit SPT12 beschichteten SAM ist der Abstand und damit die Flexibilität geringer als für die 50/50 gemischte SAM. Aufgrund des sich bei den gemischten Monolagen ergebenden Freiraums zwischen den Carboxylgruppen werden nicht nur die Bewegungsfreiräume für die Carboxylgruppen erhöht, sondern auch Raum geschaffen, der es den Cyt c Molekülen erlaubt, zwischen die EG Einheiten zu diffundieren. Die hohe Adsorption von Cyt c auf der 50/50 gemischten SAM lässt sich somit durch ein Maximum an Flexibilität der Carboxylgruppen und gleichzeitig dreidimensionaler Immobilisierung von Cyt c auf und zwischen den carboxylterminierten EG Einheiten erklären.

Das Redoxverhalten von Cyt c auf unterschiedlich zusammengesetzten Monolagen wurde elektrochemisch mittels Zyklovoltammetrie untersucht (Abbildung 5.12). Als Referenz diente das Redoxverhalten auf einer Monolage aus MUA (Abb. 5.12 a), bei der sich wie zuvor beschrieben, ein guter und reversibler Elektronentransfer zeigte. Abbildung 5.12 b zeigt das Redoxverhalten auf einer gemischten SAM mit der Zusammensetzung MUA/SPT12 (75/25). Auch hier sind deutliche Strompeaks für Hin- und Rückscan zu erkennen, die auf einen effektiven Elektronentransfer schließen lassen. Es kam jedoch zu einer deutlichen Peakseparation von etwa 130 mV, die bei einer niedrigen Vorschubgeschwindigkeit von 50 mV/s nur bei sehr langkettigen SAM Molekülen mit mehr als 11 Kohlenstoffatomen beobachtet wurde und auf eine kinetische Barriere beim Elektronentransfer schließen lässt. Der Effekt trat für die gemischte Monolage (50/50) noch deutlicher hervor. Hier betrug die Peakseparation etwa 160 mV, bei der gemischten Monolage (25/75) sogar 260 mV. Bei SAMs aus Thioalkansäuren kam es mit zunehmender Alkylkettenlänge und damit größerem Abstand zwischen Elektrode und Redoxzentrum von Cyt c zu verstärkter Peakseparation. SPT12 ist aufgrund der EG Gruppe deutlich länger als Cyt c. Mit zunehmendem Anteil an

SPT12 steigt ebenfalls der mittlere Abstand zwischen Elektrode und Cyt c an. Des Weiteren kommt es zu einer geänderten Orientierung des Proteins an der Oberfläche, die zwar zu höheren Oberflächenbedeckungen führt, nicht zwangsläufig aber einen effektiven Elektronentransfer erlaubt.

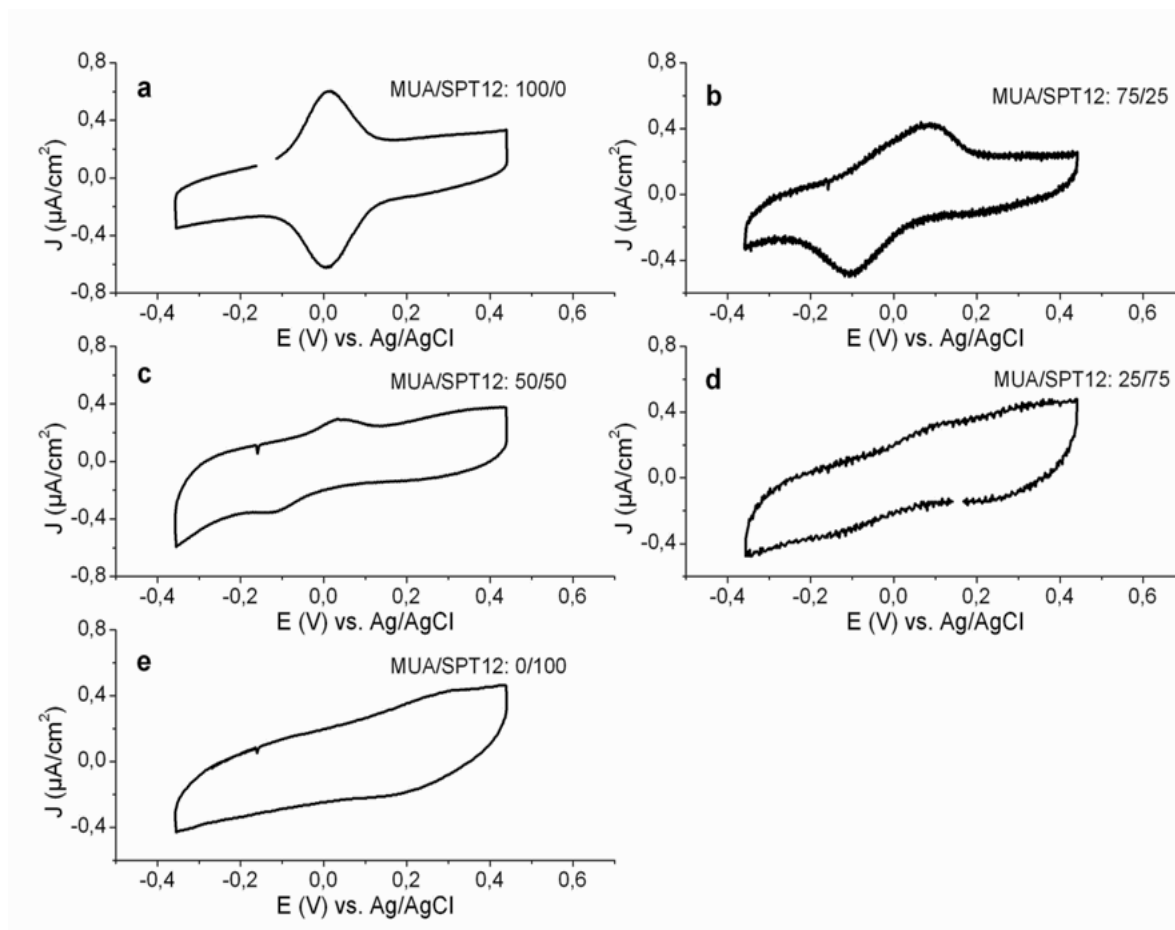


Abb. 5.12 Zyklovoltammogramme von Cyt c elektrostatisch immobilisiert auf SAMs, bestehend aus MUA und SPT12 in unterschiedlicher Zusammensetzung: (a) 100% MUA; (b) 75% MUA : 25% SPT12; (c) 50% MUA : 50% SPT12; (d) 25% MUA : 75% SPT12; (e) 100% SPT12. Alle Messungen erfolgten unter Argon Atmosphäre in 5,78 mM Phosphatpuffer pH 7 bei einer Potentialvorschubgeschwindigkeit von 50 mV/s. Die Potentiale sind gegen eine Ag/AgCl (3M KCl) Referenzelektrode gemessen.

Bei Betrachtung der Zyklovoltammogramme in Abbildung 5.12 fällt zudem auf, dass die Peakfläche mit zunehmendem SPT12 Gehalt deutlich abnimmt. Hieraus kann geschlossen werden, dass die Bedeckung mit redoxaktivem Protein mit steigendem SPT12 Gehalt abnahm. Das jedoch scheint im Widerspruch zu den SPR Ergebnissen zu stehen. Da bei der SAM (0/100) kein Redoxpeak zu beobachten war, lässt sich vermuten, dass die Distanz zwischen Elektrode und Cyt c aufgrund des langkettigen SPT12 Moleküls so groß war, dass

trotz einer hohen Bedeckung mit Protein kein Elektronentransfer erfolgen konnte. Entsprechend erklären sich auch die scheinbar verringerten Oberflächenbedeckungen, die sich aus den Flächen der Peakströme ergaben. Bei den gemischten Monolagen lag offenbar ein Teil der Cyt c Moleküle zwischen den EG Einheiten an MUA gebunden vor. Hier kam es zum Elektronentransfer. Ein weiterer Teil der Cyt c Moleküle war an SPT12 immobilisiert, wodurch es zu keinem Elektronentransfer kommen konnte. Mit zunehmendem SPT12 Gehalt der SAM sank der Anteil Cyt c, der an MUA gebunden und somit zum Ladungstransfer befähigt war. Abbildung 5.13 veranschaulicht schematisch die Einflüsse von Oberflächenbedeckung und Elektrodenabstand auf den Elektronentransfer bei Monolagen, bestehend aus MUA und SPT12.

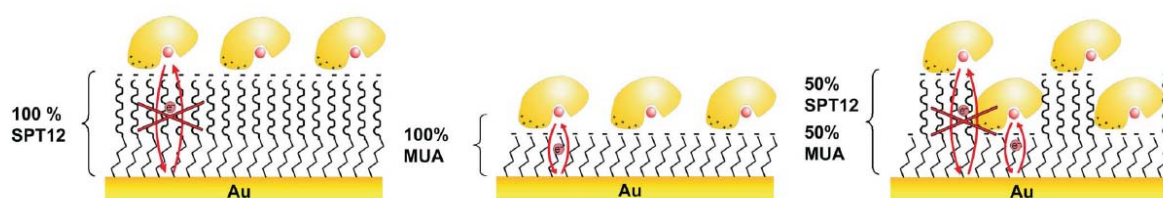


Abb. 5.13 Vereinfachte schematische Darstellung der Zusammenhänge, die den Elektronentransfer zwischen Elektrode und Cyt c auf Monolagen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen aus MUA und SPT12 beeinflussen. Links erlaubt die Moleküllänge von SPT12 keinen Elektronentransfer. In der Mitte kommt es auf kurzkettigen MUA Molekülen zu einem ungehinderten Elektronentransfer. Bei der gemischten Monolage rechts, erfolgt der Elektronentransfer trotz einer höheren Proteinbedeckung nur über die an MUA gebundenen Proteine

Somit kann abschließend festgehalten werden, dass die Immobilisierungseffizienz auf gemischten Monolagen aus MUA und SPT12, insbesondere bei einem Mischungsverhältnis von 50/50 zwar deutlich erhöht gegenüber MUA ist, sich hieraus aber kein gesteigerter Elektronentransfer ergibt. Vielmehr kommt es aufgrund des Abstandes zwischen Elektrode und an SPT12 immobilisiertem Cyt c zu einer starken Abnahme der Anzahl Proteine, die zu einem Ladungsaustausch fähig sind.

5.1.2 Kovalente Immobilisierung

Neben der elektrostatischen eignen sich vor allem kovalente Immobilisierungsstrategien zur Bindung von Redoxproteinen an Elektrodenoberflächen. Hierbei kommt es zur Ausbildung einer chemischen Bindung zwischen Aminosäureseitenketten des Proteins und der modifizierten Elektrodenoberfläche (vergleiche Kapitel 2.3.2). Aufgrund ihrer Reaktivität eignen sich besonders Thiol- und Aminogruppen für die kovalente Immobilisierung. Die Aminosäure Cystein enthält eine Thiol-Seitengruppe, die Aminosäuren Lysin, Arginin, Asparagin und Glutamin enthalten je ein $-NH_2$ in ihrer Seitengruppe. Daneben besteht das N-terminale Ende eines jeden Proteins aus einer ungebundenen Aminogruppe.

Direkte Immobilisierung auf Gold

Genau wie bei der elektrostatischen Immobilisierung muss bei der kovalenten Immobilisierung der Abstand zwischen Elektrode und Protein möglichst klein gehalten werden, um einen effizienten Elektronentransfer zu gewährleisten. Der kleinste Abstand zwischen Protein und Elektrode wird erreicht, indem das Protein direkt kovalent an die Goldoberfläche gebunden wird. Aufgrund der hohen Bindungsenergie zwischen Gold und Schwefel lässt sich ein Protein über die Aminosäure Cystein kovalent an Gold binden. In der Aminosäuresequenz von Pferdeherz Cyt c finden sich zwei Cysteine (Cys14 und Cys17) [Bushnell *et al.* 1990]. Es ist somit zu erwarten, dass sich Cyt c über die Cystein-Seitengruppen auf der Goldoberfläche immobilisieren lässt. Um zu überprüfen, ob kovalent an Gold gebundenes Cyt c Redoxeigenschaften aufweist, wurde die Goldelektrode wie unter 3.6.3 beschrieben in Cyt c Lösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung des Redoxverhaltens mittels Zyklovoltammetrie bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s (Abbildung 5.14).

Wie anhand des Zyklovoltammogramms zu erkennen ist, lässt sich kein eindeutiger Redoxpeak zuordnen. Stattdessen zeigt sich bei positiven Potentialen ein starker Stromanstieg. Bei einem Potential von 100 bis 150 mV sind schwache Schultern zu erkennen, die auf eine sehr schwache Redoxaktivität hinweisen könnten. Das Potential weicht jedoch deutlich vom Formalpotential von Cyt c ab. Aufgrund des in diesem Bereich stark ansteigenden Stromes kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Redoxpeak zumindest teilweise überdeckt ist.

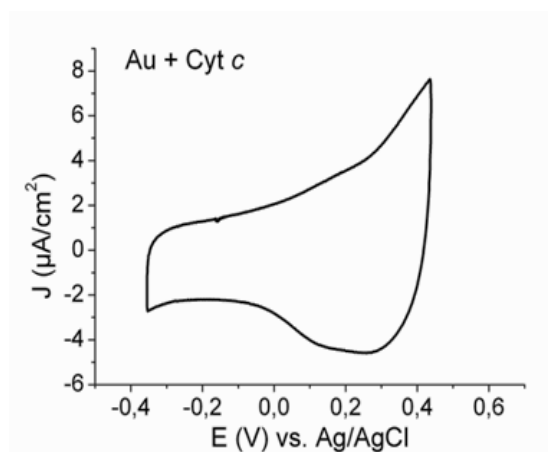


Abb. 5.14 Zyklovoltammogramm von kovalent auf Au(111) immobilisiertem Cyt c in Phosphatpuffer ($I = 5,78$ mM, pH 7,0), bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s. Die Potentiale sind bezogen auf das Potential einer Ag/AgCl Referenzelektrode (3M KCl), als Gegenelektrode diente ein Platindraht.

Der Anstieg des Stromes bei positiven Potentialen erklärt sich durch direkten Kontakt zwischen Elektrodenoberfläche und Elektrolyt. Aufgrund der hier fehlenden SAM, bildet sich die Helmholtz-Doppelschicht direkt an der Elektrodenoberfläche aus. Für kovalent auf blankem Gold immobilisiertes Cyt c war somit keine eindeutige Redoxaktivität nachzuweisen. Eine Erklärung ergibt sich bei Betrachtung der Lage und Funktion der Cysteine innerhalb des Cyt c Moleküls. So befinden sich die beiden Cysteine innerhalb des Proteins und nicht an der Proteinoberfläche. Eine Bindung des Proteins kann somit nur durch eine Umstrukturierung oder teilweise Denaturierung erfolgen. Abbildung 5.15 zeigt die Bindung der Häm-Gruppe innerhalb des Cyt c. Diese ist über die beiden Cysteine und ein Histidin kovalent an das Aminosäuregerüst von Cyt c gebunden. Kommt es zur kovalenten Bindung der Cysteine an die Goldoberfläche, wird die Bindung zur Häm-Gruppe destabilisiert, was zu einem teilweisen Verlust, zumindest aber einer Umlagerung der Häm-Gruppe führen kann. Dieses wiederum könnte den vollständigen Verlust der Redoxaktivität bewirken.

In der Literatur finden sich dennoch elektrochemische Untersuchungen mit direkt über Cystein an Gold gebundenes Cyt c [Hansen *et al.* 2003; Heering *et al.* 2004; Bortolotti *et al.* 2006]. In diesen Fällen wurde anstelle von Cyt c aus Pferdeherz, das aus *Saccharomyces cerevisiae* gewonnene Protein (YCC) verwendet. Dieses unterscheidet sich geringfügig in der Aminosäuresequenz. So findet sich an Position 102 ein weiteres Cystein. Dieses nahe am C-Terminus gelegene Cystein ermöglicht die kovalente Anbindung an Gold, ohne dass es zur Denaturierung kommt. So konnte mit YCC ein schneller und reversibler

Elektronentransfer mit einer Standardgeschwindigkeitskonstanten von $k_0 = 1,8 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ gezeigt werden [Heering *et al.* 2004].

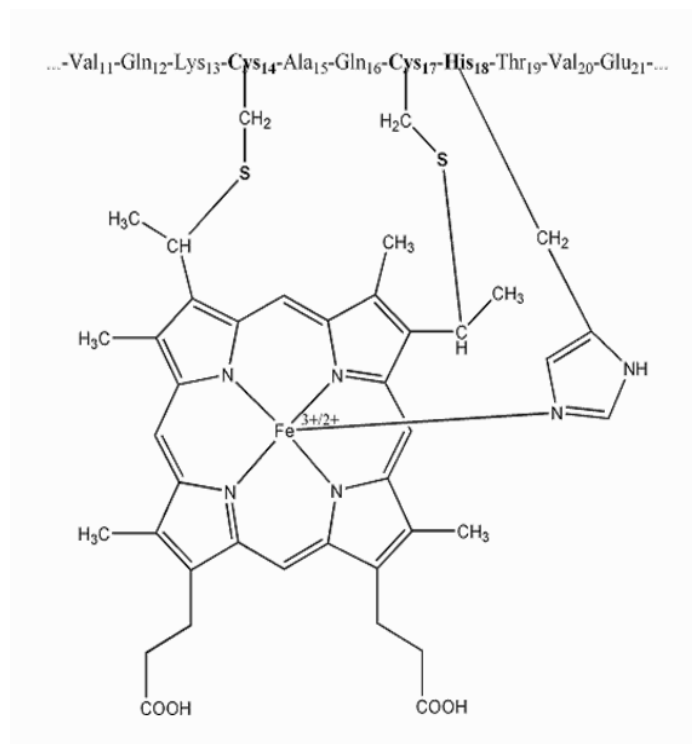


Abb. 5.15 Kovalente Bindung der Häm-Gruppe an das Aminosäurerüst von Pferdeherz Cyt c.

Immobilisierung von Cyt c über Aminogruppen

Als Alternative zur direkten, kovalenten Immobilisierung bietet sich die kovalente Immobilisierung von Cyt c über ungebundene Aminogruppen an. Von diesen finden sich aufgrund der hohen Zahl von Lysingruppen sehr viele an der Proteinoberfläche von Cyt c. Für eine kovalente Bindung muss die Goldoberfläche mit einem Reaktionspartner beschichtet bzw. aktiviert werden. Carboxylterminierte SAMs lassen sich durch Zugabe von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimide Hydrochloride (EDC) und N-hydroxysuccinimid (NHS) aktivieren, wodurch es zur Ausbildung einer Säureamidbindung zwischen Carboxylgruppe und Aminogruppe kommt (siehe Kapitel 2.3.2). Alternativ kann die Goldoberfläche auch mit einer bereits aktiven Spezies beschichtet werden, die eine gegenüber NH_2 reaktive Kopfgruppe trägt. Eine solche reaktive Gruppe kann beispielsweise aus einem N-Hydroxysuccinimidester bestehen. In der vorliegenden Arbeit wurde Cyt c auf beide Arten kovalent immobilisiert. Im ersten Fall wurde die Goldoberfläche mit einer SAM

aus 3-Thiosuccinimidylpropionat (TSP), wie unter 3.6.3 beschrieben, beschichtet. Nach Zugabe von Cyt c kam es unter Abspaltung der NHS Gruppe und Ausbildung der Säureamidbindung zur Immobilisierung. Im zweiten Fall wurde die Goldoberfläche zunächst mit einer SAM aus MUA beschichtet. In einem zweiten Reaktionsschritt erfolgte, wie unter 3.6.3 beschrieben, die Aktivierung der Kopfgruppe durch Zugabe von EDC und NHS. Das Redoxverhalten, des auf beide Weisen kovalent gebundenen Cyt c, wurde elektrochemisch mittels Zyklovoltammetrie, analog zu den vorangegangenen Untersuchungen, durchgeführt. Die Abbildungen 5.16 a/c zeigen die Zyklovoltammogramme für auf TSP (a) und aktiviertem MUA (c) gebundenes Cyt c bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s. Daneben dargestellt sind die kinetischen Untersuchungen (Abbildung 5.16 b/d) mit Vorschubgeschwindigkeiten zwischen 200 mV/s und 2000 mV/s.

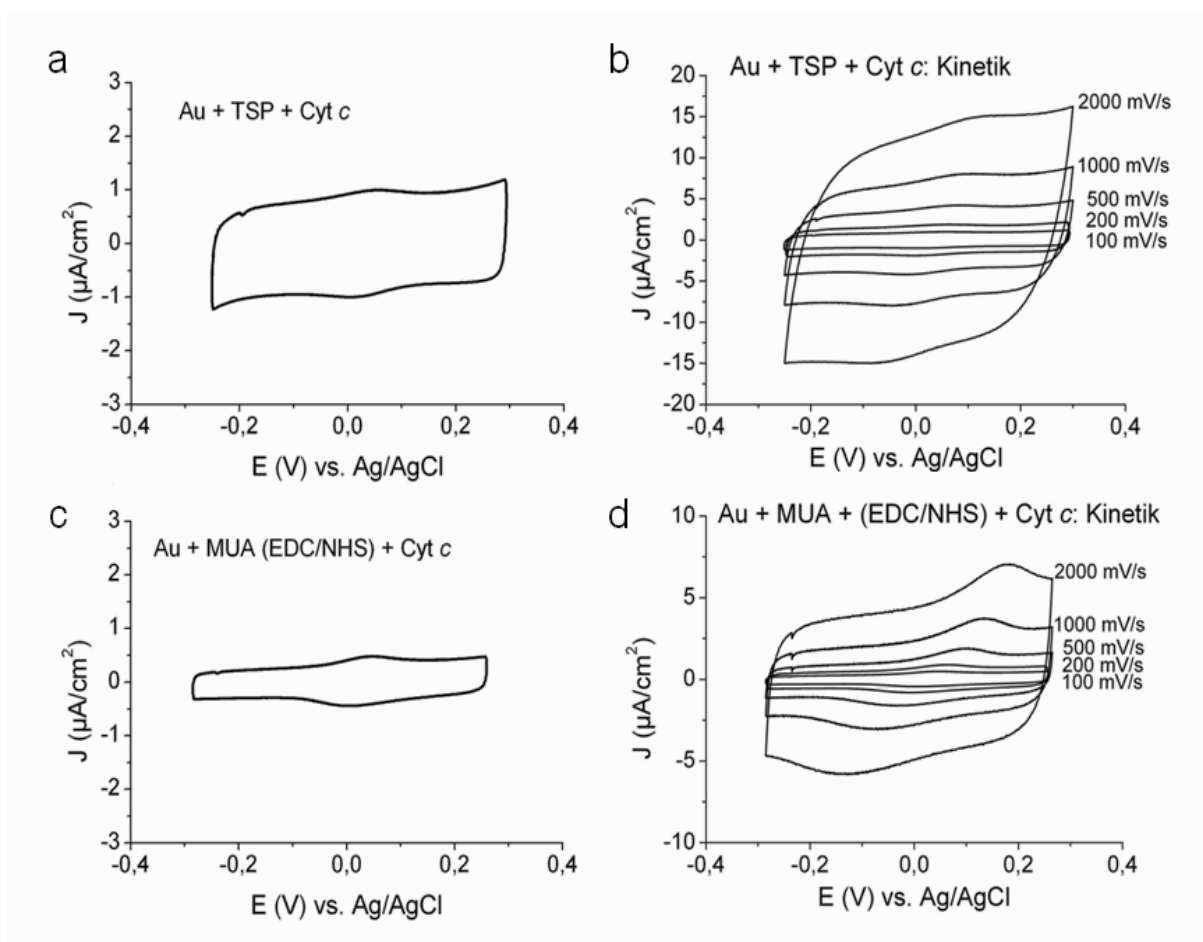


Abb. 5.16 Zyklovoltammogramme von Cyt c, kovalent immobilisiert auf TSP (a) und EDC/NHS aktiviertem MUA (c) in Phosphatpuffer ($I = 5,78 \text{ mM}$, $\text{pH } 7,0$), bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s. (b) und (d) zeigen Zyklovoltammogramme bei Potentialvorschubgeschwindigkeiten von 100 mV/s, 200 mV/s, 500 mV/s, 1000 mV/s und 2000 mV/s. Alle Potentiale sind bezogen auf das Potential einer Ag/AgCl Referenzelektrode (3M KCl), als Gegenelektrode diente ein Platindraht.

In beiden Fällen konnte ein deutliches und reversibles Redoxverhalten beobachtet werden. Die Formalpotentiale lagen mit $E_0 = 37$ mV für TSP und $E_0 = 21$ mV für aktiviertes MUA leicht verschoben gegenüber dem Literaturwert, der zwischen 3 mV und 18 mV (vs. Ag/AgCl) liegt [Song *et al.* 1993]. Die über die Flächenintegrale der Peakströme berechneten Bedeckungsgrade mit aktivem Protein liegen mit 11% für TSP und 12% für MUA deutlich unter den Vergleichswerten bei der elektrostatischen Immobilisierung auf Thioalkansäuren. Offenbar ist die kovalente Immobilisierung nicht so effizient wie die elektrostatische. Elektrostatische Immobilisierungen zeigen aufgrund der Fernwirkung der beteiligten Ladungen sehr schnelle Bindungskinetiken. Bei kovalenter Immobilisierung fehlt diese Fernwirkung, sodass der Immobilisierungsprozess deutlich länger dauert. Hinzu kommt, dass die Orientierung des Proteins auf der Oberfläche zufällig erfolgt. Auf der Proteinoberfläche befinden sich multiple freie Aminogruppen. Welche und wie viele davon die Oberflächenreaktion eingehen, ist nicht kontrollierbar. Im Gegensatz zur elektrostatischen Immobilisierung, bei der es aufgrund des Dipol-Charakters von Cyt c zu einer gleichmäßigen Orientierung des Proteins auf der Elektrodenoberfläche kommt, ist bei kovalenter Immobilisierung davon auszugehen, dass ein Großteil des immobilisierten Cyt c in einer für den Elektronentransfer ungeeigneten Orientierung vorliegt. Da der Bedeckungsgrad nichts über die tatsächliche Bedeckung mit Protein, sondern nur über die Bedeckung mit redoxaktiven Proteinen, bei denen es zum tatsächlichen Elektronentransfer kommt, aussagt, lassen sich so die sehr geringen Ladungsdichten erklären. In den Zyklovoltammogrammen ist ein deutlicher Unterschied bei den kapazitiven Strömen zu erkennen. Die Ursache hierfür liegt an der unterschiedlichen Kettenlänge. Während TSP nach Abspaltung von NHS nur aus drei Kohlenstoffatomen besteht, sind es bei MUA 11. Entsprechend erklärt sich auch das unterschiedliche kinetische Verhalten. So fällt die Peakseparation für TSP deutlich geringer aus als für MUA. Dieses geht auch aus Abbildung 5.17 hervor, wo die Peakpotentiale bzw. Peakseparation als Funktion der Scangeschwindigkeit aufgetragen sind. Die Darstellung ermöglicht den direkten kinetischen Vergleich zwischen elektrostatisch auf MUA und kovalent auf MUA immobilisiertem Cyt c. Hierbei wird deutlich, dass es bei kovalent immobilisiertem Cyt c zu einer deutlich ausgeprägteren Peakseparation kam. Selbst die Peakseparation für an TSP gebundenes Cyt c war stärker ausgeprägt, als für elektrostatisch an MUA gebundenes. Die Erklärung hierfür kann ebenfalls mit der variierenden Orientierung des kovalent immobilisierten Proteins auf der Elektrodenoberfläche gegeben werden. Hierdurch kommt es im Mittel zu einer größeren Distanz zwischen Elektrodenoberfläche und Redoxzentrum. Des Weiteren ist nicht klar, wie sich die geänderte Orientierung auf den von

[Avila *et al.* 2000] und [Murgida und Hildebrandt 2001] beschriebenen Gating-Prozess auswirkt. Die Untersuchungen von [Murgida und Hildebrandt 2001; Rivas *et al.* 2002] deuten darauf hin, dass eine definierte Orientierung der Häm-Gruppe zur Elektrode vorliegen muss, damit ein effizienter Elektronentransfer stattfinden kann. Dieses ist bei der elektrostatischen Wechselwirkung gewährleistet, die auch für die natürliche Bindung zwischen Cyt *c* und Cyt *c* Oxidase verantwortlich ist. Ob es jedoch bei einer kovalenten Bindung zu einem vergleichbaren Effekt kommt, ist nicht bekannt. Entsprechend könnten sich die errechneten niedrigen Standardgeschwindigkeitskonstanten erklären. So ergab sich für TSP ein Wert von $\text{Log } k_0 = 0,84$, der deutlich niedriger ist als der Vergleichswert von MPA, das ebenfalls aus drei Kohlenstoffatomen besteht ($\text{Log } k_0 = 1,23$; $S_{xm} = 0,12$). Auch für EDC/NHS aktiviertes MUA ergab sich ein Wert ($\text{Log } k_0 = 0,55$), der erheblich geringer ist, als der Vergleichswert von elektrostatisch auf MUA gebundenem Cyt *c* ($\text{Log } k_0 = 1,12$; $S_{xm} = 0,04$). Es muss davon ausgegangen werden, dass der mittlere Abstand zwischen Eisenzentrum und Elektrodenoberfläche größer war als bei der elektrostatischen Immobilisierung über die äquivalenten Thiocarbonsäuren. Die Werte für den Durchtrittsfaktor α liegen aber auch für kovalent gebundenes Cyt *c* zwischen 0,45 und 0,5.

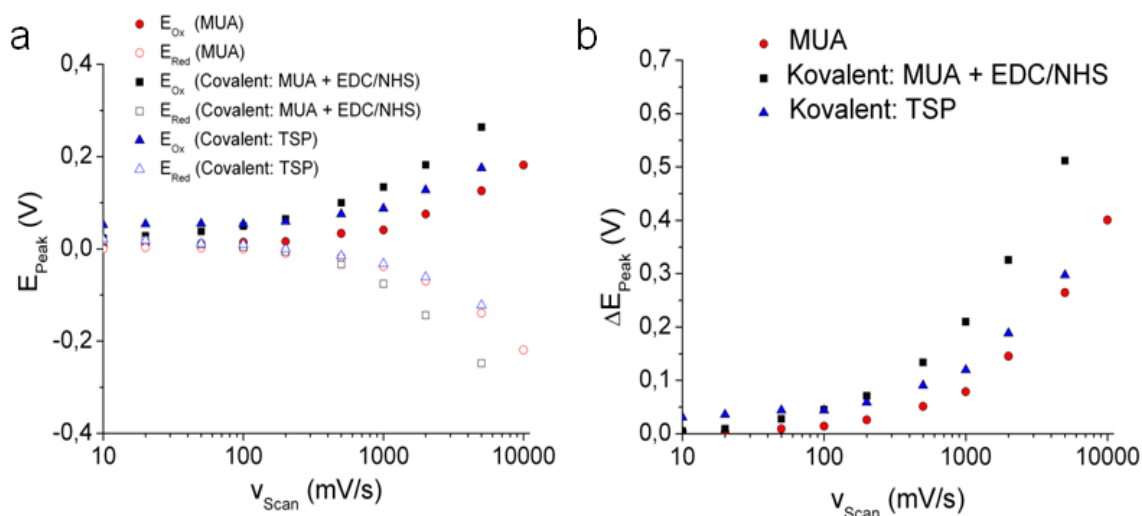


Abb. 5.17 Potentialverschiebung als Funktion der Potentialvorschubgeschwindigkeit nach Laviron (a) und als Peakpotentialdifferenz ΔE_{Peak} in Abhängigkeit von v_{Scan} (b). Gemessen wurde mit Potentialvorschubgeschwindigkeiten zwischen 10 mV/s und 5000 mV/s für kovalent auf TSP bzw. EDC/NHS aktiviertem MUA immobilisiertes Cyt *c*. Vergleichsweise sind die Werte für elektrostatisch auf MUA immobilisiertes Cyt *c* bis 10000 mV/s aufgetragen.

Insgesamt ist die kovalente Immobilisierung von Cyt c, aufgrund der fehlenden Kontrolle über die Orientierung an der Oberfläche für bioelektronische Untersuchungen weniger geeignet. Die elektrostatische Immobilisierung, insbesondere auf MUA, führte zu einem deutlich effektiveren Ladungstransfer und ist somit, unter den hier beschriebenen Bedingungen, der kovalenten Immobilisierung vorzuziehen. Für andere Anwendungen, wie z.B. der Immobilisierungen in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen, können kovalente Immobilisierungen jedoch deutlich besser geeignet sein.

5.1.3 Microperoxidase-11

Die Kinetik des Elektronentransfers zwischen der Elektrodenoberfläche und darauf immobilisiertem Cyt c, hängt von der Molekülkettenlänge der SAM, von der Orientierung des Proteins auf der SAM und dem von [Avila *et al.* 2000; Murgida und Hildebrandt 2001] beschriebenen Gating-Prozess, also der Fähigkeit des immobilisierten Proteins zur Änderung der Orientierung für einen optimierten Elektronentransfer ab. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass auch der intramolekulare Elektronentransfer innerhalb von Cyt c einen Einfluss auf die Redoxkinetik hat. Um dieses zu untersuchen wurden elektrochemische Untersuchungen an Microperoxidase-11 (MP-11) mittels Zyklovoltammetrie durchgeführt. MP-11 ist ein Polypeptid aus 11 Aminosäuren, das durch enzymatischen Verdau von Cyt c erhalten wird [Ruzgas *et al.* 1999]. Es besteht aus den Aminosäuren 11 bis 21 von Cyt c und trägt die Häm-Gruppe. Abbildung 5.15 (siehe Kapitel 5.1.2) zeigt den Teil von Cyt c, der mittels Enzymverdau abgespalten wird. Aufgrund der geringen Größe des Peptids und der frei zugänglichen Häm-Gruppe, ist MP-11 hervorragend für elektrochemische Untersuchungen des Redoxverhaltens geeignet [Lötzbeyer *et al.* 1994]. Da MP-11 jedoch keine positiv geladenen Gruppen enthält, die eine elektrostatische Bindung an Thioalkansäuren ermöglichen, musste für die Untersuchungen eine alternative Immobilisierungsstrategie angewendet werden. Für die elektrochemische Untersuchung von MP-11 auf Goldelektroden, beschrieben [Ruzgas *et al.* 1999] unterschiedliche Immobilisierungsverfahren. Hier wurde die Immobilisierung auf einer SAM aus Alkanthiolen angewendet. Die Häm-Gruppe in MP-11 ist stark hydrophob. Bei Cyt c liegt diese größtenteils innerhalb des Proteins, bei MP-11 ist sie jedoch frei zugänglich. Entsprechend lässt sich MP-11 über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der hydrophoben Alkanthiol SAM und der Häm-Gruppe immobilisieren. Um die elektrochemischen Ergebnisse von MP-11 und Cyt c auf kurz- und länger-kettigen SAMs vergleichen zu können, wurde MP-11 auf Hexanthiol (HxT) und Undecanthiol (UDT) immobilisiert. Die Zyklovoltammogramme bei

unterschiedlichen Potentialvorschubgeschwindigkeiten wurden in 1 M Natriumphosphatpuffer pH 4,2 analog zu [Ruzgas *et al.* 1999] aufgezeichnet und sind in Abbildung 5.18 gezeigt.

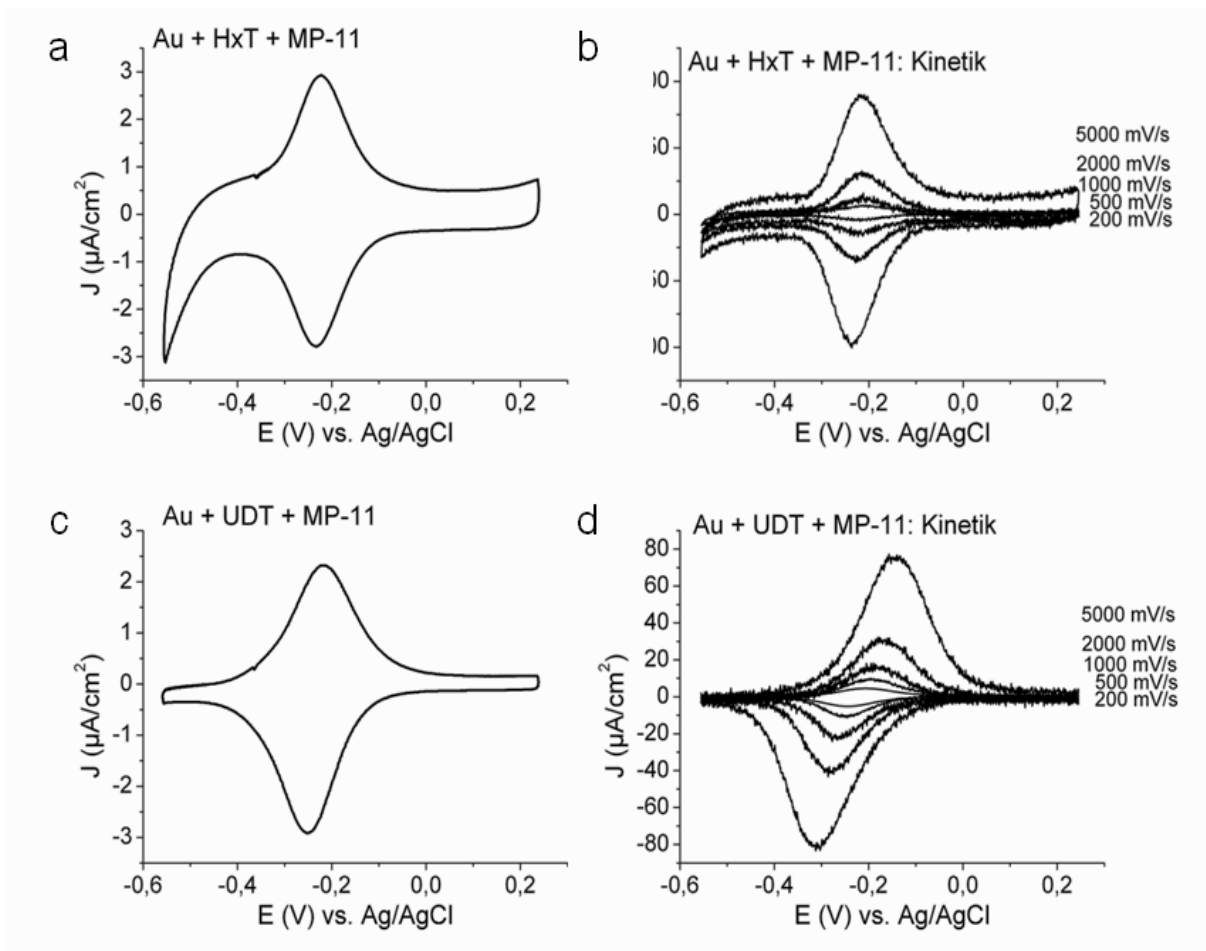


Abb. 5.18 Zyklovoltammogramme von MP-11, immobilisiert auf Alkanthiolmonolagen: (a) HxT bei 100 mV/s; (b) Kinetik auf HxT bei 200 mV/s bis 5000 mV/s; (c) UDT bei 100 mV/s und (d) Kinetik auf HxT bei 200 mV/s bis 5000 mV/s. Alle Messungen wurden in 1 M Phosphatpuffer pH 4,2 durchgeführt.

Die Untersuchungen ergaben ein deutliches Redoxverhalten von MP-11, sowohl auf HxT, als auch auf UDT. Es ergab sich in beiden Fällen ein Formalpotential von etwa -230 mV. Dieser Wert ist konsistent mit dem von [Ruzgas *et al.* 1999] gefundenen Formalpotential. Aus den Flächenintegralen der Peakströme wurden die Ladungsdichten berechnet. Diese lagen für HxT mit $2,87 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ und für UDT mit $3,97 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ deutlich über den für MHA bzw. MUA immobilisiertes Cyt *c* erhaltenen Werten ($\sigma_{\text{MHA}} = 0,89 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; $\sigma_{\text{MUA}} = 1,09 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). Der Grund hierfür liegt in der deutlich geringeren Molekülgröße von MP-11. Pro MP-11 ist genau wie beim Cyt *c* ein Elektron an der Oxidation bzw. Reduktion beteiligt. Es finden jedoch deutlich mehr MP-11 Moleküle als Cyt *c* Moleküle auf der Elektrodenoberfläche Platz. Bei Betrachtung der kinetischen Ergebnisse in Abbildung 5.18, zeigt sich für Cyt *c* auf HxT keine

erkennbare Peakseparation. Für UDT ist hingegen eine leichte Peakseparation bei höheren Scangeschwindigkeiten zu erkennen. Das geht auch aus der Darstellung in Abbildung 5.19 hervor. Hier sind die Peakpotentiale nach Laviron (Abb. 5.19 a) bzw. die Peakpotentialdifferenzen gegenüber der Scangeschwindigkeit (Abb. 5.19 b) aufgetragen. Zum Vergleich sind die für Cyt c auf MHA und MUA ermittelten Werte mit aufgetragen. Für die Darstellung nach Laviron wurde aufgrund der stark abweichenden Formalpotentiale eine zweite Y-Achse eingefügt, die einen relativen Vergleich der Peakseparation ermöglicht.

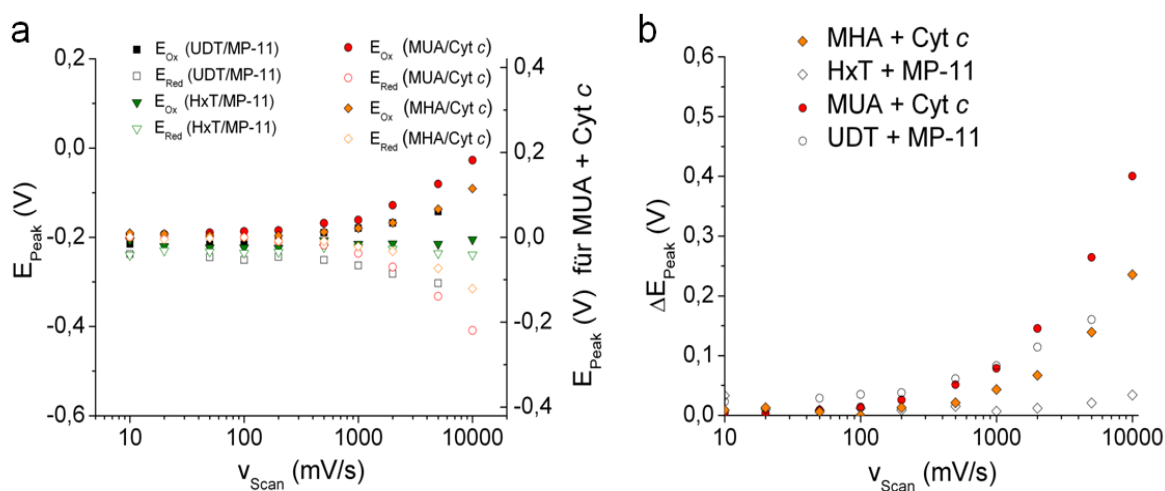


Abb. 5.19 Potentialverschiebung für HxT + MP-11 und UDT + MP-11, als Funktion der Potentialvorschubgeschwindigkeit nach Laviron (a) und als Peakpotentialdifferenz ΔE_{Peak} in Abhängigkeit von v_{Scan} (b). Gemessen wurde mit Potentialvorschubgeschwindigkeiten zwischen 10 mV/s und 10000 mV/s (5000 mV/s für HxT + MP-11). Vergleichsweise sind die Werte für auf MHA bzw. MUA immobilisiertes Cyt c bis 10000 mV/s aufgetragen.

Beim Vergleich der Potentialdifferenzen in Abhängigkeit der Potentialvorschubgeschwindigkeit zeigt sich, dass sie für MP-11 auf Alkanthiolen deutlich geringer sind, als bei den Vergleichsmessung mit Cyt c auf Thioalkansäuren. Auf HxT war selbst bei Potentialvorschubgeschwindigkeiten von 10000 mV/s nur eine minimale Peakseparation von etwa 30 mV zu beobachten. Für Cyt c auf MHA lag die Peakseparation hingegen bei 235 mV. Aufgrund der geringen Peakseparation ließen sich Durchtrittsfaktor α und Standardgeschwindigkeitskonstante k_0 nicht ermitteln, da für die Berechnung nach Laviron die Potentialdifferenz größer als 200 mV sein muss [Laviron 1979]. Auch ohne Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten wird deutlich, dass es hier zu einem erheblich schnelleren Elektronentransfer kam. Offenbar gab es trotz der gleichen Monolagen-Kettenlänge einen effizienteren Elektronentransfer. Hierfür kommen zwei Erklärungen in Frage. Durch die

hydrophobe Immobilisierung der MP-11 über die Häm-Gruppe, liegt diese in unmittelbarer Nähe zur SAM. Geht man von einer planen Ausrichtung der Häm-Gruppe zur SAM aus, so kann der Elektronentransfer von der SAM direkt auf das Eisenzentrum erfolgen. Bei Cyt c hingegen liegt die Häm-Gruppe größtenteils innerhalb des Proteins. Der Elektronentransfer erfolgt über eine Ecke der Häm-Gruppe [Dickerson und Timkovich 1975; Zhou *et al.* 2004], wobei die Elektronen zusätzlich die Porphyrinstruktur überwinden müssen, bis sie das Eisenzentrum erreichen. Dieser Abstand zwischen Eisenzentrum und SAM beträgt etwa 0,7 nm. Ein weiterer Effekt, der zu der verbesserten Kinetik bei MP-11 beitragen kann, ist die Tatsache, dass aufgrund der bereits optimalen Orientierung der Häm-Gruppe zur Elektrode, die von [Avila *et al.* 2000] beschriebene Orientierungsänderung nicht erfolgen muss, um den Elektronentransfer zu ermöglichen. In diesem Fall müssten Geschwindigkeitskonstanten über denen für kurzkettige Thioalkansäuren erzielt werden können.

5.2 Redoxverhalten von Cytochrom c auf nanostrukturierten Au Elektroden

Kapitel 5.1 befasste sich mit der Immobilisierung von Cyt c auf makroskopischen zweidimensionalen (2D) Elektroden und der Charakterisierung der Redoxeigenschaften. Makroskopische 2D Elektroden sind ideale Modellsysteme mit vernachlässigbarer Oberflächenrauigkeit. Im Folgenden sollte die Immobilisierung von Cyt c auf nanostrukturierten Elektrodenoberflächen erfolgen. Dabei handelt es sich um makroskopische Elektrodenoberflächen, die 3D Nanostrukturelemente enthalten. Aufgrund der starken Oberflächenvergrößerung besitzen sie gegenüber planaren Elektroden eine deutlich höhere Kapazität und eine größere aktive Elektrodenoberfläche, was bei elektrochemischen Messungen zu einer Steigerung der Sensitivität führt. Aus diesem Grund sind nanostrukturierte Oberflächen sehr gut für elektrochemische Biosensoren [Katz *et al.* 2004A; Patolsky *et al.* 2006] und andere bioelektronische [McKnight *et al.* 2006] und technische Anwendungen [Yoo und Park 2007; Hu *et al.* 2006] geeignet. Auch die, in der molekularen Bioelektronik angestrebten, nanoskopischen Bauelemente besitzen nanostrukturierte Oberflächen. Es ist daher von besonderem Interesse, den Einfluss der Nanostrukturierung auf die Redoxaktivität, die elektronische Kopplung zwischen Protein und Elektrode, sowie die Kinetik des Ladungstransfers zu kennen. Von oberflächenrauen Strukturen ist bekannt, dass sie im Gegensatz zu planaren Oberflächen den Ladungstransfer zu elektrostatisch immobilisiertem Cyt c begünstigen [Leopold *et al.* 2002A; Leopold *et al.* 2002B]. Bei ihren elektrochemischen Untersuchungen an unterschiedlich rauen, mit Thioalkansäuren beschichteten Goldelektroden, beobachteten [Leopold *et al.* 2002A] mit abnehmender Oberflächenrauigkeit eine Zunahme der Doppelschichtkapazität. Sie erklärten diesen Effekt mit Hilfe eines Modells, wonach auf rauen Oberflächenstrukturen die Zahl, der sich ausbildenden Wasserstoffbrücken zwischen COOH-Gruppen und Wassermolekülen, verringert ist. Hierdurch ist der strukturelle Einfluss von hydrophoben Interaktionen der aliphatischen Ketten größer, als auf planaren Substraten, und es kommt zu einer höheren strukturellen Ordnung der SAM Moleküle. Aufgrund der fehlenden Wasserstoffbrückenbindungen, ergeben sich auf rauen Oberflächen geringere pK_a -Werte. Mit zunehmender Oberflächenrauigkeit kommt es verstärkt zu Deprotonierungsreaktionen und damit zu erhöhten Ladungsdichten anionischer Carboxylate auf der SAM Oberfläche. Dadurch wird die elektrostatische Bindung von Cyt c begünstigt, sodass eine höhere Bedeckung und damit verbunden eine höhere Redoxaktivität die Folge ist [Leopold *et al.* 2002B]. Nanostrukturierte

Bauelemente weisen eine besonders ausgeprägte Oberflächenrauigkeit auf, wodurch analog zu den Beobachtungen von [Leopold *et al.* 2002A; Leopold *et al.* 2002B] eine deutliche Verringerung der Doppelschichtkapazität von carboxylterminierten SAMs, im Vergleich zu planaren Goldsubstraten und ein verbesserter Ladungstransfer zu elektrostatisch immobilisiertem Cyt c zu vermuten wäre. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob sich ein vergleichbarer Effekt bei den hier beschriebenen Au Nanopillar (NP) Elektroden nachweisen lässt.

Neben dem Einfluss der Oberflächentopographie auf den Ladungstransfer sollte untersucht werden, ob kinetische Effekte beim Ladungstransfer zwischen NP Elektrode und immobilisiertem Cyt c zu beobachten sind. Nanostrukturierte Elektroden besitzen Modellcharakter für die Beschreibung von diffusionskontrollierten faradayschen Reaktionen, da sie sowohl Eigenschaften von Makro-, als auch von Mikroelektroden besitzen. Im Gegensatz zu einzelnen Nanoelektroden werden die geringen Ströme bei nanostrukturierten Elektroden über viele Objekte integriert, sodass die elektrochemischen Signale gut detektiert werden können. Gleichzeitig herrschen die von Mikroelektroden bekannten nicht-linearen und zeitabhängigen Diffusionsbedingungen vor. Die Stärke dieses Effektes wird im Wesentlichen von den geometrischen Parametern der Nanostrukturen bestimmt. Bei dem von Mikroelektrodenanordnungen bekannten elektrochemischen Verhalten [Bockris *et al.* 2000], kann man zwischen scheibenförmigen, eingebetteten oder hemisphärischen Einzelelektroden unterscheiden, die jeweils zu unterschiedlichen Diffusionsgradienten führen und die Kinetik des Systems beeinflussen.

In der Literatur wird eine Vielzahl unterschiedlicher Typen nanostrukturierter Elektroden beschrieben. So wurden mit Hilfe von Nanopartikeln [Plieth 1982; Pappas *et al.* 2007], *Nanotubes* [Musameh *et al.* 2002; Yu *et al.* 2003], *Nanobands* [Morris *et al.* 1987], *Nanofibers* [Nguyen-Vu *et al.* 2006] und *Nanopillars* modifizierte Elektroden für unterschiedliche Anwendungen hergestellt. Die Methoden zur Herstellung von nanostrukturierten Elektroden lassen sich unterteilen in direkte lithographische Methoden, unter Verwendung eines Elektronen- oder fokussierten Ionenstrahls, Template basierende Methoden und Methoden, die auf Nanopartikel Wachstum und Selbstorganisationsprozessen basieren. Bei der Herstellung sind vor allem die auf Selbstorganisation basierenden Methoden von Vorteil, da sie mit geringem Aufwand auf große Flächen angewendet werden können. Im Gegensatz zu sich zufällig ausbildenden Nanostrukturen, sind besonders Ansätze von Interesse, die eine kontrollierte Strukturierung zu großflächigen und gleichmäßig angeordneten Nanostrukturen ermöglichen. Eine besonders effiziente Methode

zur Herstellung von Gold-Nanopillar Strukturen beschreiben [Wolfrum *et al.* 2006B; Sanders und Tan 2003]. Hier kam eine Technik zum Einsatz, die auf Selbstorganisation beruht. Die Autoren stellten Nanopillar Strukturen mit Hilfe von Membranen aus porösem anodisiertem Aluminiumoxid her, indem sie in die Poren galvanisch Gold abschieden. Durch Kontrolle der Prozessparameter während der Herstellung ergab sich eine definierte Variabilität der Nanopillar Geometrie [Wolfrum *et al.* 2006B]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte Cyt c elektrostatisch auf solche mit NP bedeckten Elektroden immobilisiert und der Ladungstransfer charakterisiert werden. Für die Untersuchungen war eine exakte Bestimmung der tatsächlich elektroaktiven Oberfläche zwingend erforderlich. Entsprechend sollte die Oberflächenvergrößerung mit Hilfe unterschiedlicher Methoden charakterisiert werden. Die Herstellung der NP Strukturen ist nach [Wolfrum *et al.* 2006B] unter 3.6.1 beschrieben.

5.2.1 Oberflächencharakterisierung von Au Nanopillar Elektroden

In früheren Untersuchungen wurde bereits versucht, die elektroaktive Oberfläche nanostrukturierter Elektroden und ihr Beitrag an dem elektrochemischen Signal zu bestimmen [Forrer *et al.* 2000; Anandan *et al.* 2006; McKnight *et al.* 2003]. Hierbei ergaben sich widersprüchliche Aussagen, sodass die tatsächliche Beziehung, zwischen realer 3D redoxaktiver Oberfläche und elektrochemischem Signal, bei nanostrukturierten Elektroden nicht eindeutig geklärt werden konnte.

Um diesen Widerspruch und die Prozesse an der elektrochemisch aktiven Oberfläche von Gold NP Strukturen aufklären zu können, wurden an unserem Institut vergleichende elektrochemische Untersuchungen durchgeführt [Schröper *et al.* 2008]. Zunächst wurde die dreidimensionale (3D) Oberfläche der nanostrukturierten Elektroden mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) geometrisch bestimmt. Abbildung 5.20 zeigt REM Bilder einer mit NP bedeckten Elektrode, bei unterschiedlicher Vergrößerung in Aufsicht (a/c) und unter einem Betrachtungswinkel von 60° (b). Die Bilder zeigen, dass die NP eine einheitliche Struktur ohne Segmentierung oder Verzweigung und nur geringen Größenunterschieden haben und die Oberfläche gleichmäßig dicht bedecken. Größere Defekte sind nicht zu erkennen.

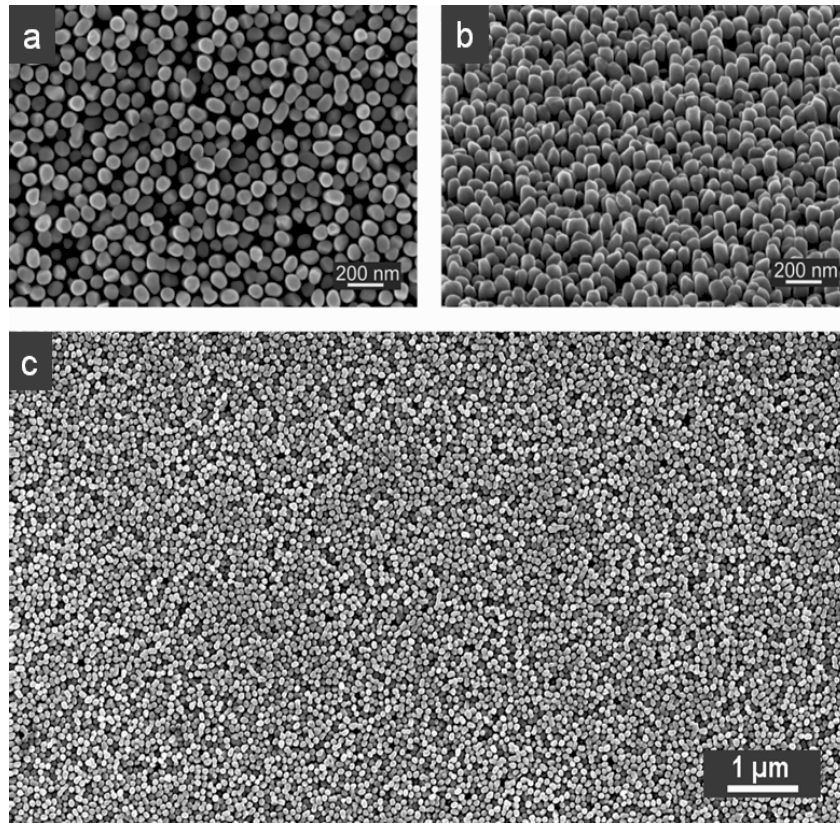


Abb. 5.20 REM Aufnahmen von Gold NP Strukturen, hergestellt durch elektrochemische Deposition in poröse Aluminiumoxid Templates auf einem Au/Ti/Si Substrat: Detailansicht von oben (a) und von der Seite (b); (c) zeigt einen größeren Ausschnitt in Aufsicht.

REM Aufnahmen wurden verwendet, um die geometrischen Dimensionen individueller NP zu messen. Für jede untersuchte Probe wurde eine repräsentative Anzahl NP zur Bestimmung des durchschnittlichen Durchmessers d_{NP} , der mittleren Höhe h_{NP} und des Abstandes der NP untereinander x_{NP} verwendet. Die Ermittlung der Höhe h_{NP} erfolgte aus Querschnitten unter einem Betrachtungswinkel von 60° unter dem REM. Aus diesen Werten und der Grundfläche der Elektrode A_0 von $0,26 \text{ cm}^2$ wurde die 3D Oberfläche A_{3D} nach folgender Formel berechnet:

$$A_{3D} = A_0 + \frac{\pi d_{NP} h_{NP} A_0}{\sin 60^\circ (x_{NP} + d_{NP})^2} \quad (5.7)$$

Der mittlere Durchmesser, die mittlere Höhe und der mittlere Abstand der NP wurde aus der Gesamtzahl der untersuchten Proben bestimmt, die alle unter den gleichen Bedingungen hergestellt wurden. Die jeweilige Standardabweichung des Mittelwertes S_{xm} ist in Klammern

angegeben. Es ergaben sich Werte von $d_{NP} = 56 \text{ nm}$ ($S_{xm} = 1$); $h_{NP} = 184 \text{ nm}$ ($S_{xm} = 3$) und $x_{NP} = 23 \text{ nm}$ ($S_{xm} = 2$). Verglichen mit einer planaren Au Elektrode mit der gleichen Grundfläche A_0 , ergab sich mit dieser Untersuchungsmethode eine Oberflächenvergrößerung um den Faktor 7,1 mit einer Standardabweichung von $S_{xm} = 0,27$.

Basierend auf dieser Messung wurden unterschiedliche elektrochemische Verfahren zur Oberflächenabschätzung eingesetzt und miteinander verglichen (Tabelle 5.5). Die Doppelschichtkapazität C_{DL} wurde von acht Proben relativ zur Grundfläche mittels Zyklovoltammetrie bestimmt [Schröper *et al.* 2008]. Hierbei zeigte sich, dass die NP Elektroden im Vergleich zu planaren, aufgrund ihrer Oberflächenvergrößerung höhere Ströme zum Laden der Doppelschichtkapazität an der Grenzfläche zwischen Elektrode und Elektrolyt aufweisen. Aus diesen unterschiedlichen kapazitiven Eigenschaften errechnete sich ein Oberflächenvergrößerungsfaktor von 5,6 ($S_{xm} = 0,51$). Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde eine zweite Methode zur Bestimmung der Doppelschichtkapazität C_{DL} verwendet, die elektrochemische Impedanzspektroskopie [Schröper *et al.* 2008]. Basierend auf diesen Daten ergab sich ein effektiver Faktor für die Oberflächenvergrößerung von 11,3 ($S_{xm} = 1,0$), der in etwa doppelt so groß ist, wie der zuvor mittels Zyklovoltammetrie ermittelte Wert. Der Grund für diesen Unterschied konnte nicht abschließend geklärt werden, ist aber Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Ergänzend wurden redoxaktive Moleküle verwendet, um die elektroaktive Oberfläche anhand von Ladungstransferprozessen an der NP Elektrodenoberfläche zu ermitteln. Zunächst wurde ein diffusionskontrolliertes System mit Kaliumhexacyanoferrat ($K_4[Fe(CN)_6]$) zur Oberflächencharakterisierung eingesetzt, das bereits zuvor für die Untersuchung nanostrukturierter Elektroden Verwendung fand [Forrer *et al.* 2000; Anandan *et al.* 2006]. Abbildung 5.21 zeigt die Zyklovoltammogramme von NP und planarer Gold Elektrode in 1 M KCl mit 1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$. Wie für alle in diesem Zusammenhang durchgeführten elektrochemischen Messungen, wurde die Kurve auf eine Grundfläche von 1 cm^2 normiert. Für das Redoxpaar Fe^{2+}/Fe^{3+} ergaben sich ein anodisches Peakpotential E_{Ox} von etwa 300 mV und ein kathodisches E_{Red} von ca. 240 mV.

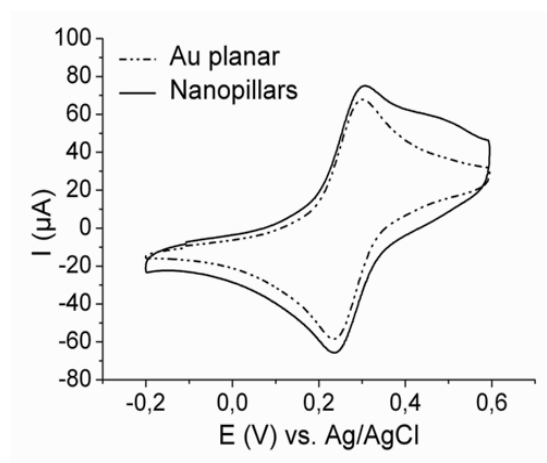


Abb. 5.21 Zyklovoltammogramme von Au Nanopillar (durchgehende Linie) und planarer (unterbrochene Linie) Elektrode in 1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ mit 1 M KCl, als Elektrolyt bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s.

Die anhand des diffusionslimitierten Redoxprozesses an der Elektrodenoberfläche ermittelten Peakströme waren um den Faktor 1,45 ($S_{xm} = 0,09$) höher, als die für planare mit der gleichen geometrischen Grundfläche gemessenen. Hier ergab sich somit ein Oberflächenvergrößerungsfaktor für die elektroaktive Oberfläche von 1,45 (Tabelle 5.5). Dieser Wert ist deutlich kleiner als alle zuvor ermittelten Werte. Auf vergleichbare Werte kamen auch [Anandan *et al.* 2006] bei den Untersuchungen an Au Nanopillar Elektroden. Hier ergaben sich mit $K_4[Fe(CN)_6]$ 1,4- bis 1,9-fache Oberflächenvergrößerungen. Interessanterweise beschrieben auch [Forrer *et al.* 2000] für Au *Nanowire* Anordnungen einen ähnlichen Effekt und zeigten eine deutliche Steigerung des Verhältnisses zwischen 3D Oberfläche und der durch Diffusion zugänglichen Fläche, verglichen zu makroskopisch flachen Goldelektroden. Die von [Forrer *et al.* 2000] für *Nanowire* Elektroden gemessenen faradayschen Peakströme waren sogar nur etwa halb so groß, wie die planarer Goldelektroden. Dieses Verhalten lässt sich mit einer, von linearer Diffusion kontrollierten, faradayschen Reaktion an der Elektrodenoberfläche erklären, deren durch Diffusion zugängliche Fläche verringert ist. Bei den hier beschriebenen Au NP Elektroden ist aufgrund des Diffusionsprozesses bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s von einer Verknappung der Redoxspezies zwischen den Nanopillars auszugehen, sodass diese Flächen nicht mehr zum Ladungstransfer beitragen können. Die einzelnen Nanopillar verhalten sich somit wie hemisphärische Einzelelektroden, bei denen der Redoxprozess nur an den oberen Bereichen stattfinden kann. Hierdurch ist die elektroaktive Oberfläche deutlich reduziert und es ergibt sich in der Summe nur eine Oberflächenvergrößerung um den Faktor 1,45. Die von [Forrer *et al.* 2000] beschriebene, gegenüber planaren Substraten verringerte,

elektroaktive Oberfläche ist auf den gleichen Effekt zurückzuführen. Die Geometrie und dichtere Anordnung der Nanostrukturen führt dort offenbar zu einer noch schnelleren Verknappung der Redoxspezies, sodass die Oberflächenbereiche, die einen Beitrag zum Redoxprozess leisten können, deutlich kleiner sind.

Die zuvor beschriebenen Methoden zur Analyse der Au NP Oberflächenvergrößerung basierten auf kapazitiven Effekten und diffusionskontrollierten Redoxprozessen und lieferten diskrepante Aussagen. Um die Limitierungen diffusionskontrollierter Systeme zu umgehen, können oberflächengebundene Redoxsysteme zur Bestimmung der elektroaktiven Oberfläche von Au NP Elektroden genutzt werden. Eine vielversprechende Au-Oxidationsmethode wurde von [Leopold *et al.* 2002A] für die Oberflächencharakterisierung strukturierter Elektrodenoberflächen verwendet und geht auf [Oesch und Janata 1983; Vela *et al.* 1990] zurück. Dieser Ansatz basiert auf der Oxidation bzw. Reduktion der Oberflächen-Goldatome. Aus den hierbei messbaren Ladungsstromdichten ist eine Abschätzung der elektroaktiven Goldoberfläche möglich. Der Potentialbereich wurde analog zu den Literaturvorgaben gewählt, um eine Oxidation der tiefer gelegenen Goldatome zu vermeiden. Abbildung 5.22 zeigt die Zyklovoltammogramme für planare und nanostrukturierte Substrate.

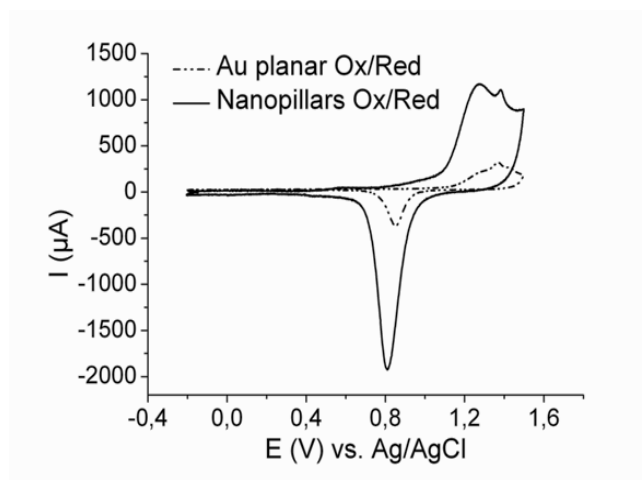


Abb. 5.22 Oxidation und Reduktion von Au Nanopillars (durchgehende Linie) und planarem Gold (unterbrochene Linie) in 0,1 M H_2SO_4 , bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s. Die Graphen wurden normiert auf eine Grundfläche von 1 cm^2 .

Während des anodischen Potentialvorschubs startete die Oxidation bei Potentialen über 1 V, gemessen gegen das Potential einer Ag/AgCl Referenzelektrode [Dickertmann *et al.* 1974; Nieto *et al.* 2003]. Der Oxidationspeak der Au NP ist deutlich vergrößert gegenüber dem von planarem Au und zeigt eine abweichende Form. Für die Bestimmung der

Oberflächenvergrößerung wurde der Reduktionspeak bei einem Potential von etwa 800 mV verwendet. Durch Integration des kathodischen Strompeaks ergab sich die experimentelle Ladungsdichte für die Reduktion des Au-Oxids an der Elektrodenoberfläche $\sigma_{Red(exp)}$, die mit der theoretischen Ladungsdichte $\sigma_{Red(theor)}$ einer bekannten Au Oberfläche verglichen wurde. Der von [Leopold *et al.* 2002A] ermittelte theoretische Wert $\sigma_{Red(theor)}$ beträgt $448 \mu\text{C}/\text{cm}^2$. Bezogen auf diesen Wert, errechnete sich aus der Gesamtzahl von 11 untersuchten Proben eine mittlere Oberfläche der Nanopillar Struktur von $1,5 \text{ cm}^2$ ($S_{xm} = 0,09$) und ein Oberflächenvergrößerungsfaktor von 5,9 ($S_{xm} = 0,36$). Verglichen mit den anderen Untersuchungsmethoden, ergibt sich hier eine vergleichsweise gute Übereinstimmung mit dem Wert, der mit Hilfe der geometrischen Bestimmungsmethode erzielt wurde.

Zusätzlich zu der Goldoxidation wurde immobilisiertes Ferrocenhexanthiol (FcHxT), ein Redoxmolekül, zur zykovoltammetrischen Bestimmung der elektroaktiven Oberfläche verwendet. Wie unter 3.6.2 beschrieben wurde FcHxT mit Hexanthiol co-immobilisiert, um eine homogene Oberflächenbedeckung zu erhalten. Die entsprechenden Zykovoltammogramme für Au NP und planare Elektroden sind in Abbildung 5.23 dargestellt.

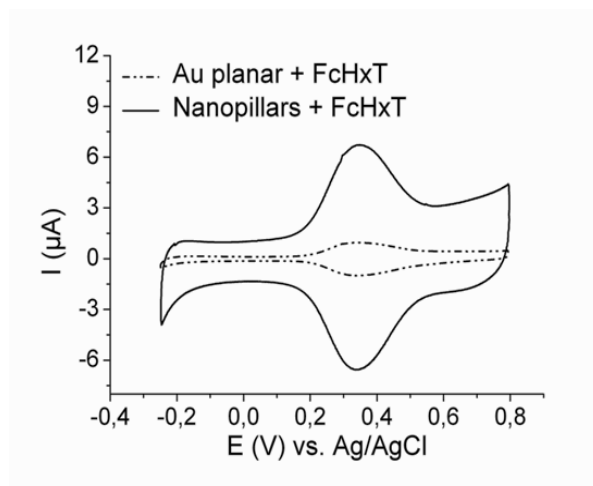


Abb. 5.23 Zykovoltammogramme von Au Nanopillars (durchgehende Linie) und planarem Gold (unterbrochene Linie) mit immobilisiertem FcHxT in 0,1 M H_2SO_4 , bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s.

Hierbei zeigte sich ein deutliches Redoxverhalten der immobilisierten Spezies. Während des anodischen Potentialvorschubs mit einer Geschwindigkeit von 100 mV/s wurde das Eisenzentrum des FcHxT bei einem Peakpotential von 340 mV von Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert und anschließend während des Rückscans beim selben Potential reversibel reduziert. Auch hierbei ergaben sich für NP gegenüber planaren Substraten, deutlich größere Peakflächen

und höhere Ladungsströme, was auf die Oberflächenvergrößerung der NP zurückzuführen ist. Durch Integration der oxidativen bzw. reduktiven Peakflächen ergab sich die Bedeckung an redoxaktiven Molekülen. Durch Vergleich der Werte planarer und nanostrukturierter Proben, konnte anhand der bekannten planaren Elektrodenfläche von $0,35 \text{ cm}^2$ die NP Elektrodenoberfläche berechnet und der Oberflächenvergrößerungsfaktor bestimmt werden. Aus den insgesamt sechs untersuchten NP Proben ergab sich eine Fläche von $1,4 \text{ cm}^2$ ($S_{xm} = 0,16$) und ein Oberflächenvergrößerungsfaktor von $5,3$ ($S_{xm} = 0,65$). Dieses Ergebnis stimmt ebenfalls gut mit dem geometrisch aus den REM Aufnahmen ermittelten Wert überein, obwohl der Wert geringer ist als bei der Au-Oxid Reduktionsmethode.

Tabelle 5.5 fasst alle durchgeführten Versuche und die dabei ermittelten Werte für die elektroaktive Oberfläche von Au NP Elektroden und die entsprechenden Oberflächenvergrößerungsfaktoren, bezogen auf planares Au, übersichtlich zusammen und erlaubt einen besseren Vergleich der einzelnen Methoden.

Tab. 5.5 Vergleich der Ergebnisse zur Bestimmung der Au Nanopillar Strukturen mit Hilfe unterschiedlicher Methoden. In Klammern angegeben ist die Standardabweichung vom Mittelwert S_{xm} .

	REM	Kapazitive Methoden:		Auf Ladungstransfer basierende Methoden:		
		EIS NaCl	CV NaCl	Diffusions- kontrolliert CV $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	Nicht Diffusionskontrolliert CV Au Ox/Red	CV FcHxT
Anzahl der Proben	12	8	8	8	11	6
Au-NP Oberfläche [cm^2]	1,8 (0,08)	3,1 (0,18)	1,3 (0,07)	0,35 (0,01)	1,5 (0,09)	1,4 (0,16)
Faktor Oberflächen- vergrößerung	7,1 (0,27)	11,3 (1,0)	5,6 (0,51)	1,45 (0,09)	5,9 (0,36)	5,3 (0,65)

Wie aus der tabellarischen Übersicht zu erkennen ist, gibt es Methoden die zu ähnlichen Ergebnissen führten und andere, die vollkommen abweichende Werte lieferten. Besonders starke Abweichungen zeigten die mittels Impedanzspektroskopie und mittels diffusionskontrolliertem Redoxsystem ermittelten Werte. Der große, impedanzspektroskopisch ermittelte Oberflächenvergrößerungsfaktor, lässt sich nicht allein mit der vergrößerten 3D Oberfläche erklären. Die andere, auf Zyklovoltammetrie basierende, kapazitive Methode hingegen lieferte Werte, die recht gut mit den mittels REM bestimmten übereinstimmen. Das andere Extrem bilden die mit Hilfe des diffusionskontrollierten

Redoxsystems bestimmten Werte. Hier ergab sich der kleinste aller gemessenen Oberflächenvergrößerungsfaktoren. Diese Abweichung kann mit der Annahme erklärt werden, dass aufgrund der Diffusionslimitierung des Systems nur ein Teil der NP tatsächlich an den Redoxreaktionen beteiligt und die elektroaktive Oberfläche entsprechend kleiner als die 3D Oberfläche ist. Die Diffusionslimitierung ist abhängig von den geometrischen Dimensionen der Nanostrukturen, wie Tiefe und Breite der Zwischenräume zwischen den NPs. Hierdurch wird bestimmt, welcher Teil der NP für die diffundierenden Redoxmoleküle zugänglich ist. Bei den hier untersuchten Strukturen kann davon ausgegangen werden, dass die Redoxspezies nur die oberen Bereiche der NP, nicht aber den Boden erreicht.

Im Gegensatz zu dem diffusionskontrollierten System, zeigten die Experimente mit oberflächengebundenen Redoxsystemen sehr einheitliche Werte, die vergleichsweise nahe an den mittels REM bestimmten Werten für die Oberfläche bzw. die Oberflächenvergrößerung der NP Strukturen lagen. In allen Fällen ergaben sich Werte unterhalb der geometrisch bestimmten Oberflächenvergrößerung. Für die untersuchten elektrochemischen Systeme war auch von einer etwas geringeren, höchstens aber annähernd gleichen elektroaktiven Oberfläche im Vergleich zur tatsächlichen 3D Oberfläche auszugehen. Grund hierfür ist, dass die 3D Fläche mit einer idealisierten Methode geometrisch aus gemittelten Werten berechnet wurde, die keine Defekte oder partiellen Passivierungen berücksichtigt. Gerade diese werden jedoch bei den elektrochemischen Methoden miteingefasst. Derartige Passivierungen können beispielsweise durch Kontaminationen auf der Oberfläche oder Rückstände der Barriere-Schicht vom Fabrikationsprozess zustande kommen. Somit erklären sich die etwas geringeren Werte für die elektrochemisch bestimmte Oberflächenvergrößerung der Nanopillar Strukturen. Die geometrische Oberflächenbestimmung mittels REM Aufnahmen ist aufgrund der vielen zu messenden und statistisch zu bestimmenden Einzelgrößen ein sehr zeitaufwendiger Prozess und lässt sich nur für Strukturen mit homogen anwachsender Oberfläche anwenden. Des Weiteren ist die Oberflächenbestimmung mittels REM keine *in-situ* Methode, die gerade für biosensorische Anwendungen von Vorteil wäre. In solchen Fällen bietet sich eine Oberflächenbestimmung mit Hilfe der hier untersuchten nicht-diffusionskontrollierten Redoxsysteme an. Die beste Übereinstimmung mit der geometrisch bestimmten Oberfläche ergab sich bei dem mittels Au-Oxid Reduktion bestimmten Wert. Hierbei zeigte sich auch eine sehr kleine Standardabweichung, was damit zu erklären ist, dass alle am Ladungstransfer beteiligten Spezies unmittelbar an der Grenzfläche zwischen Elektrode und Elektrolyt vorliegen. Diese Methode scheint somit sehr gut für die reproduzierbare

Charakterisierung von nanostrukturierten Oberflächen geeignet zu sein. Mit einem Oberflächenvergrößerungsfaktor von 5,6 ebenfalls recht nahe am geometrischen Wert von 7,1 liegt der kapazitiv mittels Zyklovoltammetrie ermittelte Wert. Ebenso geeignet für die Bestimmung der elektroaktiven Oberfläche von Nanostrukturen ist die Methode mit immobilisierten, nicht-diffusionskontrollierten Redoxsystemen. Hier zeigte sich eine etwas größere Abweichung als bei den anderen beiden Methoden. Die kann mit Defekten in der Molekülschicht erklärt werden, die Zusätzlich zu den Defekten auf der Oberfläche auftreten. Zudem kann es aufgrund der unterschiedlichen Oberflächenmorphologie zwischen planaren und nanostrukturierten Elektroden zu nicht vollkommen vergleichbaren Immobilisierungsergebnissen kommen. Da FcHxT mit Hexanthiol co-immobilisiert wurde, und die Adsorptionskoeffizienten beider Moleküle an den Kanten von Terrassen und Treppenstrukturen abweichen können, sind unterschiedliche Bedeckungsgrade nicht auszuschließen. Insgesamt zeigte sich im Vergleich zu den mittels Impedanzspektroskopie bzw. diffusionskontrolliertem Redoxsystem ermittelten Ergebnissen nur eine geringe Abweichung von den geometrisch bestimmten Werten. Zudem bieten immobilisierte Systeme den Vorteil, dass bei ausreichender Immobilisierungszeit die gesamte Oberfläche der Nanopillar Strukturen mit der entsprechenden Redoxspezies bedeckt ist.

5.2.2 Redoxverhalten von Cytochrom c auf Au Nanopillar Elektroden

Im Folgenden sollte Cyt c auf Au NP Strukturen elektrostatisch immobilisiert und Unterschiede im Redoxverhalten, bezogen auf planare Elektrodenoberflächen, diskutiert werden. Die Immobilisierung erfolgte analog zu planaren Au(111) Elektroden elektrostatisch auf MUA. Anschließend erfolgte die Charakterisierung des Ladungstransfers elektrochemisch mittels Zyklovoltammetrie, bei unterschiedlichen Vorschubgeschwindigkeiten. Abbildung 5.24 a zeigt die Zyklovoltammogramme von elektrostatisch immobilisiertem Cyt c auf planaren Au(111) und NP Elektroden. Wie zu erkennen ist, ergab sich für die NP Elektroden bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s ein für Cyt c typisches Zyklovoltammogramm mit ausgeprägtem Oxidationspeak, bei einem Peakpotential von 34 mV und entsprechendem Reduktionspeak bei -36 mV. Hieraus ergibt sich ein Formalpotential von etwa 0 mV. Dieses deckt sich sehr gut mit dem in der Literatur beschriebenen Formalpotential für Cyt c [Song *et al.* 1993] und dem auf planaren, mit MUA beschichteten Au(111) Elektroden ermittelten Formalpotential (vergleiche Kapitel 5.1).

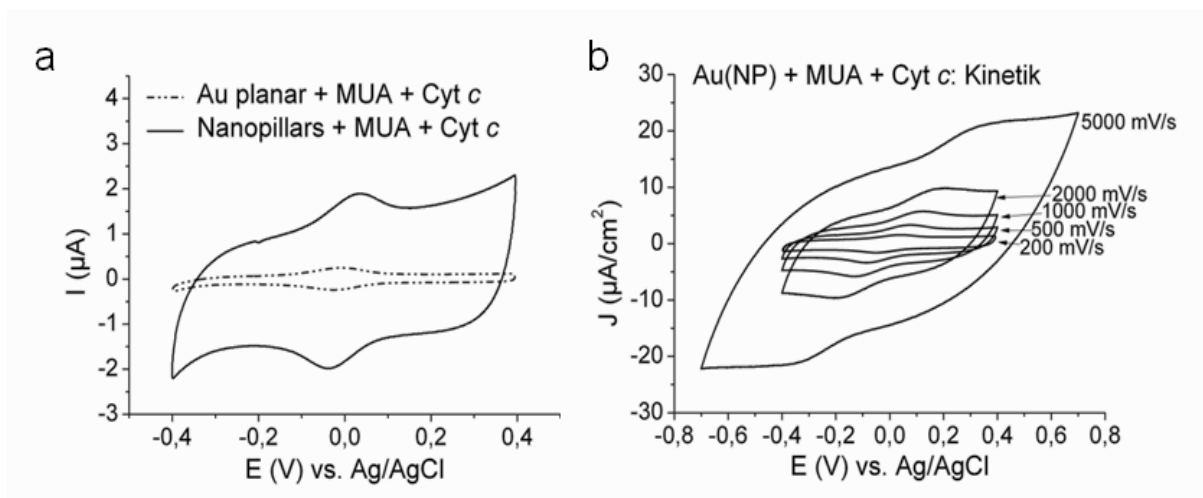


Abb. 5.24 Zyklovoltammogramme von Cyt c immobilisiert auf MUA beschichteten Au Elektroden in Phosphatpuffer ($I = 5,78 \text{ mM}$, $\text{pH } 7,0$): (a) Planares Au (unterbrochene Linie) und Au Nanopillar Elektrode (durchgehende Linie) bei 100 mV/s ; (b) Nanopillar Elektrode bei Potentialvorschubgeschwindigkeiten 200 mV/s bis 5000 mV/s . Die Potentiale sind bezogen auf das Potential einer Ag/AgCl Referenzelektrode (3M KCl), als Gegenelektrode diente ein Platindraht.

Deutlich zu erkennen sind die Unterschiede im kapazitiven Anteil der Zyklovoltammogramme und den Redoxpeakflächen aufgrund der Oberflächenvergrößerung durch die NP Strukturen. Analog zu den Experimenten mit FcHxT wurde die NP Oberfläche aus den Flächenintegralen des oxidativen Strompeaks und anhand der bekannten Oberfläche planarer Au Elektroden von $0,35 \text{ cm}^2$ ermittelt. Insgesamt wurden 6 Nanopillar Proben auf diese Weise untersucht. Hierbei ergab sich eine mittlere Oberfläche von $1,5 \text{ cm}^2$ ($S_{xm} = 0,2$) und eine Oberflächenvergrößerung um Faktor 5,7 ($S_{xm} = 0,9$) im Vergleich zur Grundfläche von $A_0 = 0,26 \text{ cm}^2$. Dieses Ergebnis lässt sich sehr gut mit den Werten vergleichen, die mit Hilfe der anderen nicht-diffusionskontrollierten Methoden bestimmt wurden und eine recht gute Annäherung an die mit Hilfe des REM ermittelte 3D Oberfläche darstellen. Vergleicht man die Ergebnisse von immobilisiertem Cyt c mit denen von FcHxT, so ergeben sich für FcHxT aufgrund der geringeren Standardabweichung etwas verlässlichere Werte. Bei der Immobilisierung von Proteinen wie Cyt c muss berücksichtigt werden, dass es vereinzelt zu unvorhersehbaren und nicht kontrollierbaren Denaturierungsereignissen kommen kann. Hierdurch geht bei diesen Molekülen die Redoxaktivität verloren, sodass die Bereiche auf der Elektrode blockiert sind und nicht mehr als elektroaktiv detektiert werden können. Zur Vergrößerung der Standardabweichung kommt es zudem durch die Tatsache, dass ein geringer Anteil des eingesetzten Proteins keine Redoxaktivität zeigte und hierdurch zusätzlich partielle Bereiche der Elektrodenoberfläche blockiert wurden. Solche

Blockierungseffekte erfolgen unabhängig von sterischen Behinderungen durch die NP. Ein aufgrund der Oberflächentopographie effizienterer Ladungstransfer zu immobilisiertem Cyt c, wie von [Leopold *et al.* 2002B] für raue Goldoberflächen beschrieben, ließ sich bei den Nanopillar Strukturen nicht nachweisen. Die experimentellen Befunde, die mit 2D Makroelektroden in Bezug auf die Redoxantwort in Abhängigkeit der Immobilisierung erhalten wurden, können somit mit einiger Sicherheit auf nanodimensionierte Bauelemente übertragen werden.

Bei der kinetischen Betrachtung zeigten sich gegenüber unstrukturierten Au Oberflächen allerdings deutlichere Unterschiede. Mit höheren Potentialvorschubgeschwindigkeiten ergab sich eine stärker ausgeprägte Peakseparation. Dieses wird besonders in der Darstellung nach [Laviron 1979], im direkten Vergleich zur Kinetik MUA beschichteter, planarer Au(111) Elektroden, deutlich (Abbildung 5.25 a). Des Weiteren kam es mit zunehmender Potentialvorschubgeschwindigkeit zu einer Verkipfung und Streckung des Zyklovoltammogrammes (Abbildung 5.24 b).

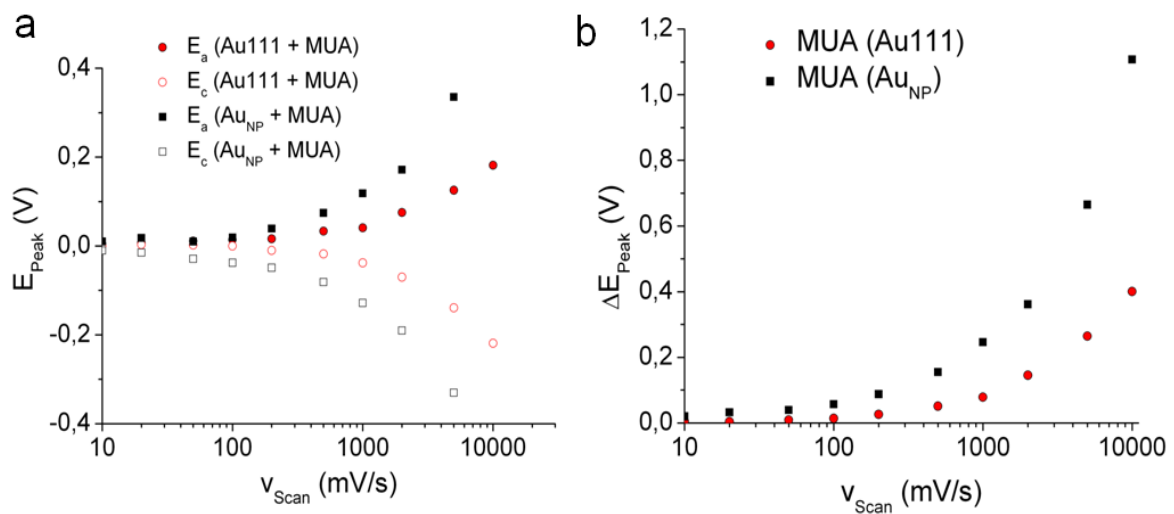


Abb. 5.25 Potentialverschiebung für Cyt c, elektrostatisch immobilisiert auf planaren und nanostrukturierten Au Elektroden, als Funktion der Potentialvorschubgeschwindigkeit nach Laviron (a) und als Peakpotentialdifferenz ΔE_{Peak} in Abhängigkeit von v_{Scan} (b). Gemessen wurde mit Potentialvorschubgeschwindigkeiten zwischen 10 mV/s und 10000 mV/s.

Noch deutlicher als aus der Darstellung nach Laviron geht der Unterschied der Peakpotentiale aus Abbildung 5.25 b hervor. Hier ist die Potentialdifferenz als Funktion der Potentialvorschubgeschwindigkeit gezeigt. Während die Potentialdifferenzen bei niedrigen Vorschubgeschwindigkeiten für planare und nanostrukturierte Elektroden noch recht ähnlich

waren, zeigte sich ab einer Vorschubgeschwindigkeit von etwa 100 mV/s, eine deutlich stärkere Zunahme der Peakseparation bei nanostrukturierten Elektroden. Bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 5000 mV/s ergab sich für NP Elektroden bereits eine um den Faktor 2,5 größere Peakseparation, als auf planaren Au(111) Elektroden. Bei 10000 mV/s erhöhte sich der Unterschied nochmals auf einen Faktor von etwa 2,8. Obwohl in beiden Fällen Cyt c elektrostatisch auf MUA beschichteten Goldelektroden gebunden wurde, zeigten sich unterschiedliche kinetische Eigenschaften. Die bei den Au NP Elektroden beobachtete, deutlich erhöhte Peakseparation, lässt sich nur durch die Nanopillar Strukturen bzw. einen durch die schmalen Spalten zwischen den NP bedingten Einfluss des Elektrolyten erklären. Zusätzlich ergab sich eine Abhängigkeit zwischen Potentialvorschubgeschwindigkeit und Ladungsdichte. Im Gegensatz zu diffusionskontrollierten Systemen, war hier eigentlich nicht von einer solchen Abhängigkeit der Potentialvorschubgeschwindigkeit auszugehen. Dennoch zeigte sich, wie aus Abbildung 5.26 hervorgeht, dass die Ladungsdichte bei nanostrukturierten Elektrodenflächen mit zunehmender Vorschubgeschwindigkeit abnahm, wohingegen die Ladungsdichte bei planaren Elektroden im Wesentlichen konstant blieb.

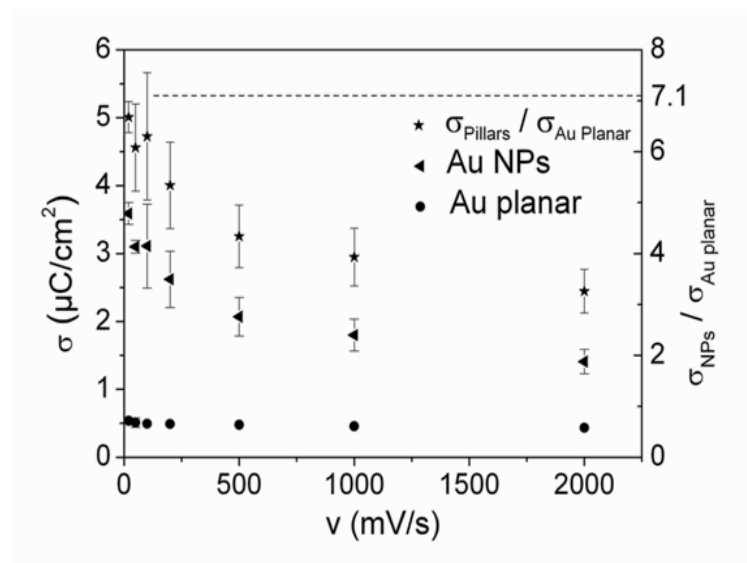


Abb. 5.26 Abhängigkeit der Ladungsstromdichte von der Potentialvorschubgeschwindigkeit v für auf Nanopillars (Dreiecke) und planarem Gold (Kreise) immobilisiertes Cyt c in 5,78 mM Phosphatpuffer. Zusätzlich ist der Oberflächenvergrößerungsfaktor, ermittelt aus dem Quotienten der Ladungsstromdichten, aufgetragen (Sterne). Der geometrisch aus den REM Bildern bestimmte Oberflächenvergrößerungsfaktor von 7,1 ist durch die unterbrochene Linie angedeutet.

In Abbildung 5.26 wurde eine zweite Achse für den Oberflächenvergrößerungsfaktor eingefügt. Da dieser sich aus dem Verhältnis der beiden Ladungsdichten $\sigma_{\text{NPs}} / \sigma_{\text{Au planar}}$

errechnet, ergeben sich mit zunehmenden Potentialvorschubgeschwindigkeiten geringere Werte. Für sehr kleine Potentialvorschubgeschwindigkeiten nähert sich der Wert dem geometrisch ermittelten Oberflächenvergrößerungsfaktor von 7,1 immer mehr an, ohne ihn jedoch zu erreichen. Die Ladungsdichten bei Scangeschwindigkeiten unter 20 mV/s konnten aufgrund des großen Fehlers bei sehr kleinen Strömen nicht zuverlässig ermittelt werden. Derartige kinetische Einflüsse konnten bei planaren Elektroden nicht beobachtet werden. Die deutliche Zunahme der Peakseparation und eine Verkippung der Zyklovoltammogramme bei hohen Potentialvorschubgeschwindigkeiten, ließen bereits einen zusätzlichen Einfluss auf die Kinetik des Elektronentransfers vermuten. Die Ursache könnte ein nicht kompensierter Elektrolytwiderstand sein, der mit zunehmender Tiefe der Au NP ansteigt. Die erstaunliche Abnahme der Ladungsdichte mit zunehmender Potentialvorschubgeschwindigkeit kann als Folge dieses Effektes gesehen werden. Aufgrund des stark erhöhten Elektrolytwiderstandes bei den NP Elektroden, im Vergleich zu planaren Elektroden, kommt es mit zunehmender NP Tiefe zu einer ungleichförmigen Verschiebung des Redoxpotentials von Cyt c zu positiveren Potentialen. Als Folge dessen, ergibt sich ein sehr flacher und asymmetrischer Peakstrom, sodass bei der Peakintegration nur ein Teil der tatsächlich geflossenen Ladungsmenge berücksichtigt wird. Entsprechend ergaben sich die bei hohen Potentialvorschubgeschwindigkeiten beobachteten niedrigeren Werte für die Oberflächenvergrößerung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für NP Elektroden mit Hilfe von elektrostatisch immobilisiertem Cyt c, bei niedrigen Vorschubgeschwindigkeiten eine vergleichbare Oberflächenvergrößerung ermittelt werden konnte, wie mit Hilfe anderer nicht-diffusionskontrollierter Systeme. Dieses System kann somit ebenfalls zur Bestimmung der Oberflächenvergrößerung nanostrukturierter Elektroden verwendet werden. Eine Begünstigung des Ladungstransfers aufgrund der Oberflächenstrukturierung konnte nicht beobachtet werden. Es zeigte sich aber ein deutlicher kinetischer Effekt, der mit steigender Potentialvorschubgeschwindigkeit zu hohen Peakseparationen und niedrigeren Ladungsdichten führt. Verlässliche Messwerte werden somit nur bei niedrigen Potentialvorschubgeschwindigkeiten <100 mV/s erreicht.

Bei der Herstellung von nanodimensionierten Bauelementelektroden müssen die elektrischen Zuleitungen isoliert werden. Die Dicke der Zuleitungsisolationsschichten ist oft größer als der Durchmesser der aktiven Elektrodenfläche. Das hat zur Folge, dass die Elektroden vertieft in dielektrischen Materialien eingelassen und somit nicht frei zugänglich sind. Es ergeben sich daher Vertiefungen, die mit den Spalten zwischen den NP Strukturen vergleichbar sind. Als Folge muss auch bei nanodimensionierten bio-anorganischen

Bauelementen mit einem verstärkten Einfluss des Elektrolytwiderstandes gerechnet werden. Hierdurch kann beispielsweise die Kopplungseffektivität der elektrochemischen Steuerungselektrode reduziert werden, sodass höhere Steuerspannungen erforderlich werden.

5.3 Bifunktionale Immobilisierung von rekombinantem Cytochrom c auf Elektrodenoberflächen

Insgesamt konnten vier rekombinante Cyt c Varianten mit eingefügten Affinitätstags exprimiert und erfolgreich aufgereinigt werden (siehe Kapitel 4). Im Folgenden sollte überprüft werden, ob sich die rekombinanten Proteine zur bifunktionalen Immobilisierung auf Goldelektroden eignen und ein reversibler Elektronentransfer zwischen Elektrode und immobilisiertem Cyt c mit Hilfe elektrochemischer Methoden gemessen werden kann.

5.3.1 Oberflächenimmobilisierung

Das Immobilisierungsverhalten auf Goldoberflächen im Vergleich zu nativem Cyt c wurde mittels Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR) untersucht. Es sollte sowohl eine elektrostatische Immobilisierung auf MUA, als auch eine über die unterschiedlichen Affinitätstags erfolgen. Um konzentrationsabhängige Effekte nach Möglichkeit auszuschließen wurden vergleichbare Proteinkonzentrationen eingesetzt (ca. 10 μM). Dabei wurde der nach [Bradford 1976] ermittelte Proteingehalt zu Grunde gelegt (siehe Kapitel 4.4). Zunächst erfolgte die Untersuchung der elektrostatischen Immobilisierung von allen rekombinanten Cyt c Varianten auf MUA (Abbildung 5.27). Dieses Immobilisierungsverfahren hatte zuvor für kommerzielles Cyt c die besten Elektronentransfereigenschaften ergeben. Für kommerzielles Cyt c zeigte sich das typisch Langmuirsche Adsorptionsverhalten. Nach Zugabe der Cyt c Lösung kam es zu einer sehr schnellen Bindung an die Oberfläche, die innerhalb von 5-10 min zu einer gesättigten Adsorption und keiner weiteren Bindung von Cyt c führte. Bei anschließendem Spülen mit 5,78 mM Phosphatpuffer pH 7,0 ließ sich eine kurzzeitige und nur sehr geringe Abnahme in der Kurve erkennen. Dieses deutet auf eine unter diesen Bedingungen irreversible Immobilisierung und nur wenige unspezifisch gebundene Proteine hin. Ein nahezu identisches Immobilisierungsverhalten zeigte sich für den rekombinanten Wildtyp Cyt c (Wt). Die Änderung der Reflektivität und damit der Bedeckungsgrad waren identisch. Auch Cyt c (Wt) konnte irreversibel gebunden werden. Lediglich in der Anfangskinetik der Kurven zeigten sich geringe Variationen, die jedoch nicht signifikant sind. Hierdurch wird bestätigt, dass auch in Bezug auf das Immobilisierungsverhalten zwischen kommerziellem und rekombinantem Wt Cyt c kein erkennbarer Unterschied besteht.

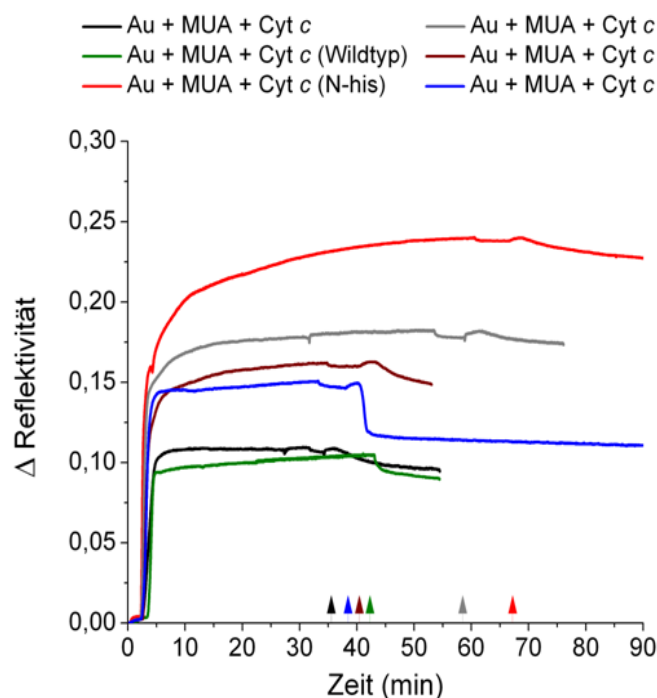


Abb. 5.27 SPR-Untersuchung der elektrostatischen Immobilisierung von unterschiedlichen Cyt *c* Varianten auf MUA beschichteten Au Oberflächen. Dargestellt ist die zeitliche Änderung der Reflektivität. Die Injektion der Cyt *c* Lösung erfolgte zum Zeitpunkt $t = 0$ min. Die Pfeile (▲) markieren den jeweiligen Zeitpunkt, an dem die entsprechende Cyt *c* Lösung gegen Puffer ausgetauscht wurde.

Deutliche Unterschiede in Bezug auf das elektrostatische Immobilisierungsverhalten zeigten sich jedoch bei allen rekombinanten Cyt *c* Varianten mit Affinitätstag. Die SPR Kurven lassen erkennen, dass es in allen vier Fällen zu deutlich höheren Bedeckungsgraden mit Protein kam. Am deutlichsten fällt dieser Effekt bei Cyt *c* (N-his) auf, wo die Reflektivitätsänderung mehr als doppelt so groß war, wie bei Wt Cyt *c*. Auch für Cyt *c* (C-his) und Cyt *c* (NC-his) ergaben sich deutlich höhere Bedeckungen, wobei diese jeweils ähnliche Werte erreichten. Des Weiteren ergab sich für alle His getaggtten Cyt *c* Varianten eine deutlich langsamere Immobilisierungskinetik, im Vergleich zum Wildtyp. All diese Beobachtungen deuten auf ein verändertes Immobilisierungsverhalten der His getaggtten Cyt *c* Varianten hin. Die höhere Bedeckung ist vermutlich auf eine geänderte Oberflächenanordnung von Cyt *c* zurückzuführen. Auch die Bildung einer Doppel- oder Multilage ist denkbar. Als Ursache kommen Wechselwirkungen zwischen den His getaggtten Proteinen in Betracht, die zur Ausbildung von Aggregaten führen. Derartige Aggregate können entstehen, wenn mehrere Histidine an die Metallionen benachbarter Proteine koordinieren. Je nach Position des His Tags ergaben sich unterschiedliche Bedeckungen, da vermutlich der sterische Einfluss des

His Tags zu einer veränderten Orientierung des Proteins führte. Die Bindungskurve von Cyt c (C-cys) zeigt ein ebenfalls abweichendes Immobilisierungsverhalten. Hier kam es zu einer schnellen Oberflächenanbindung innerhalb weniger Minuten nach Zugabe des Proteins, wie es für elektrostatische Immobilisierungen typisch ist [Johnsson *et al.* 1991]. Es zeigte sich auch hierbei eine deutlich größere Oberflächenbedeckung als bei kommerziellem Cyt c, was erneut auf die Bildung einer Multilage oder veränderte Oberflächenorientierung schließen lässt. Durch Spülen mit Puffer kam es hier aber zur teilweisen Desorption der gebundenen Proteine innerhalb kürzester Zeit. Dieses Verhalten lässt vermuten, dass es zu Wechselwirkungen der Proteine untereinander kommt. Denkbar wäre z.B. die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Cys Tags einzelner Proteine. Beim Spülen mit Puffer wurde ein Teil der auf diese Weise unspezifisch gebundenen Proteine freigesetzt. Die Desorption erfolgte sehr schnell. Wenige Minuten nach Beginn des Spülvorgangs erreichte die Bedeckung mit Cyt c (C-cys) einen Wert, der nur noch leicht über dem von kommerziellem Cyt c lag. Hier kann also, nachdem unspezifisch gebundenes Cyt c desorbiert ist, von ähnlichen Bedeckungsgraden ausgegangen werden. Insgesamt gelang es, alle rekombinanten Cyt c Varianten elektrostatisch zu immobilisieren, wobei es jedoch durch die Affinitätstags zu einer veränderten Bindungskinetik und Oberflächenorientierung kam.

Nachfolgend sollte die Immobilisierung auf Au Oberflächen über den jeweiligen Affinitätstag mittels SPR untersucht und in einem weiterführenden Experiment geprüft werden, ob sich das jeweilige rekombinante Protein für eine bifunktionale Immobilisierung eignet. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 5.28 b gezeigt. Hierbei wurde zunächst die Au Oberfläche nach der Methode von [Ataka *et al.* 2004B] mit einer SAM aus TSP und NiNTA beschichtet (siehe Kapitel 3.6.3), die eine Bindung des His Tags ermöglichen sollte.

Nach Zugabe der Cyt c Lösung kam es in allen drei Fällen zu einer effizienten Oberflächenimmobilisierung, die innerhalb von 10-30 min zu einer gesättigten Kurve und damit maximaler Oberflächenbedeckung mit His getaggttem Cyt c führte. Der Kurvenverlauf entspricht dem in der Literatur beschriebenen Bindeverhalten von His getaggtten Proteinen auf NiNTA funktionalisierten Oberflächen [Schmid *et al.* 1997]. Durch anschließendes Spülen mit Puffer ließ sich annähernd kein Cyt c desorbieren, was auf die hohe Spezifität der Bindung über den His Tag und keine signifikanten unspezifischen Wechselwirkungen zurückzuführen ist. Wt Cyt c ließ sich in einem Kontrollexperiment an diese Oberfläche nicht immobilisieren. Zum Vergleich ist in Abbildung 28 b die elektrostatische Immobilisierung von kommerziellem Cyt c gezeigt.

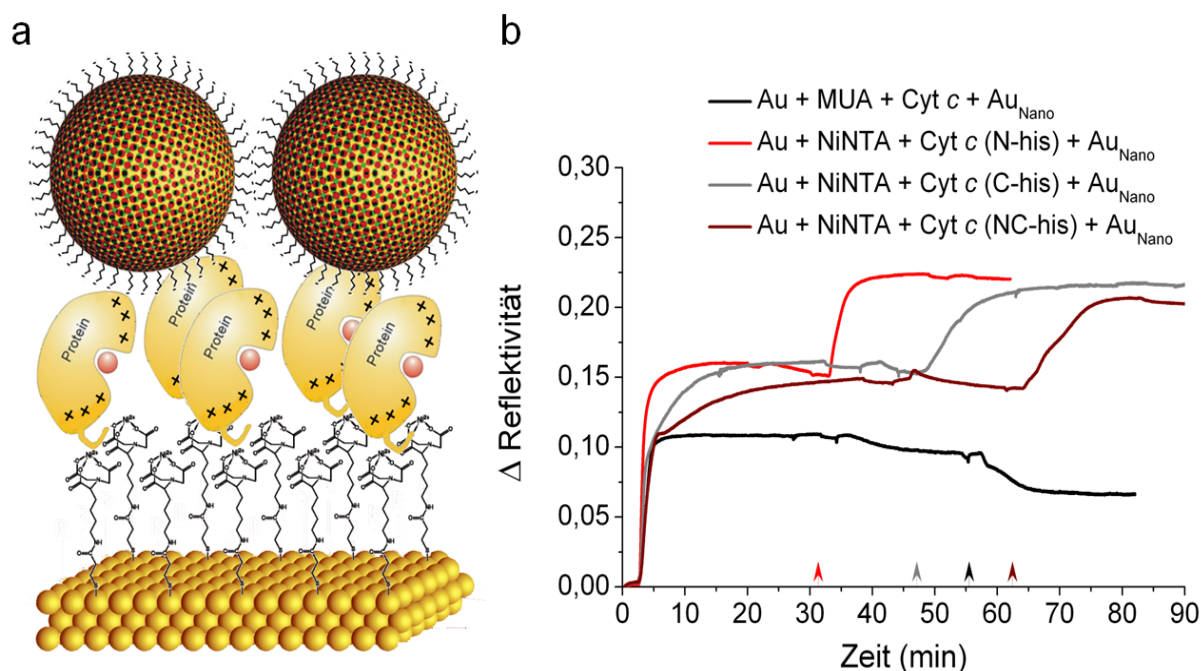


Abb. 5.28 (a) Schematische Darstellung der über den His Tag an NiNTA funktionalisiertes Au gebundenen Proteine, mit darauf elektrostatisch gebundenen Au Nanopartikeln; (b) SPR-Untersuchung der Immobilisierung von unterschiedlichen Cyt c Varianten über den His Tag auf NiNTA beschichteten Au Oberflächen. Dargestellt ist die zeitliche Änderung der Reflektivität. Die Injektion der Cyt c Lösung erfolgte zum Zeitpunkt $t = 0$ min. Die Pfeile (▲) markieren den jeweiligen Zeitpunkt, an dem die entsprechende Cyt c Lösung gegen eine Au Nanopartikel Lösung ausgetauscht wurde. Zum Vergleich ist die elektrostatische Immobilisierung von kommerziellem Cyt c und die Interaktion mit Au Nanopartikeln gezeigt.

Entsprechend den Erwartungen ergab sich bei elektrostatischer Immobilisierung eine deutlich schnellere Bindungskinetik. Dies ist auf die Fernwirkung der elektrostatischen Wechselwirkung zurückzuführen. Auch die Kinetiken der drei His getaggtten Cyt c Varianten wichen voneinander ab. Am effektivsten konnte dabei Cyt c (N-his) gebunden werden. Bis zur vollständigen Immobilisierung von Cyt c (C-his) war etwa doppelt so viel Zeit erforderlich. Die schlechteste Bindungskinetik ergab sich für Cyt c (NC-his) mit zwei His Tags an N- und C-terminaler Position. Cyt c (NC-his) kann über seine beiden His Tags an insgesamt zwei NiNTA Gruppen binden. Hierdurch wird die Zahl frei zugänglicher NiNTA Gruppen reduziert und damit die Anbindung weiterer Proteine verzögert. Die Untersuchungen zeigten, dass bei allen His getaggtten Cyt c Varianten, neben der elektrostatischen Immobilisierung, auch eine erfolgreiche und irreversible Immobilisierung über den His Tag möglich ist.

Durch elektrostatische Anbindung von Au Nanopartikeln (Au_{Nano}) mit einem Durchmesser von 5 nm an die bereits über den His Tag gebundenen Proteine (Abbildung 5.28 a) sollte geprüft werden, ob eine simultane bifunktionale Immobilisierung über His Tag und elektrostatische Wechselwirkung möglich war. Dieses ist für eine Immobilisierung von Cyt c zwischen zwei Elektroden zwingend erforderlich, um die Orientierung zu kontrollieren. In Abbildung 5.28 b ist nach Zugabe der negativ geladenen Au Nanopartikel zu dem bereits immobilisierten rekombinanten Cyt c in allen drei Fällen ein erneuter Anstieg der Reflektivität zu erkennen, der sich nur mit einem zweiten Immobilisierungsprozess erklären lässt. Dabei konnte es sich nur um die elektrostatische Immobilisierung der Au Nanopartikel auf dem bereits immobilisierten Protein handeln. Auf NiNTA funktionalisierten Au Oberflächen, ohne immobilisiertes Cyt c, kam es zu keiner Bindung der Au Nanopartikel. Ein Kontrollversuch mit elektrostatisch auf MUA immobilisiertem kommerziellem Cyt c zeigte, dass es in diesem Fall zu keiner elektrostatischen Anbindung der Au Nanopartikel an die Oberfläche kam, stattdessen war nach Zugabe der Nanopartikel Lösung eine Abnahme der Bedeckung mit Cyt c zu beobachten. Die Au Nanopartikel können nicht elektrostatisch an ebenfalls elektrostatisch gebundenes Cyt c binden, ohne dass diese Bindung zwischen SAM und Protein geschwächt wird. Cyt c kann offenbar stets nur an einen Bindungspartner elektrostatisch gebunden sein. Als Folge dieser Konkurrenzreaktion kommt es vermutlich zur teilweisen Desorption von Cyt c, welches an die Au Nanopartikel bindet und aus der Durchflusszelle entfernt wird.

Es wurden bereits Untersuchungen zu dem elektrostatischen Immobilisierungsverhalten von Cyt c mittels SPR durchgeführt [Salomon 2005], die zu vergleichbaren Ergebnissen führten. Die Oberflächenmorphologie von immobilisiertem Cyt c wurde mittels AFM und STM untersucht und eine homogene Bedeckung gezeigt [Salomon 2005]. Bei der hier untersuchten elektrostatischen Immobilisierung von His getaggttem Cyt c mittels SPR, ergaben sich deutlich höhere Bedeckungen. Zur Aufklärung dieses Effektes wurde die Oberflächenmorphologie ebenfalls mittels AFM untersucht. Abbildung 5.29 zeigt die Oberflächenmorphologie von elektrostatisch auf MUA immobilisiertem Cyt c (N-his) mit Höhenprofil entlang einer Linie.

Zu erkennen sind zwei Arten von Strukturen, eine relativ homogene Hintergrundstruktur und darüber einzelne punktuelle Strukturen. Die Hintergrundstruktur ähnelt der von [Salomon 2005] beobachteten Oberflächenstruktur von elektrostatisch immobilisiertem Cyt c. Die aus dieser Ebene herausragenden oder über ihr liegenden Strukturen haben eine vertikale Höhe von 2 nm bis 3 nm. Es könnte sich dabei um Cyt c Moleküle handeln, die wie zuvor

beschrieben, Aggregate über His Tags bilden. Es kann sich jedoch auch um andere Proteine handeln, die bei der Aufreinigung nicht vollständig entfernt wurden, eine Affinität zu Cyt c haben und sich somit an die Cyt c Schicht anlagern.

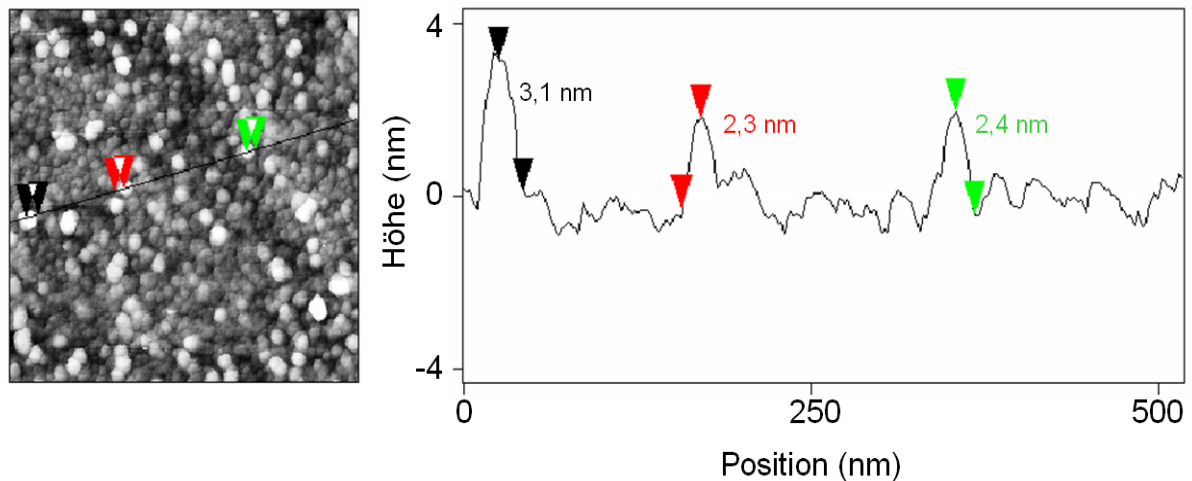


Abb. 5.29 AFM Aufnahme von auf MUA elektrostatisch immobilisiertem Cyt c (N-his) mit Höhenprofil entlang der eingezeichneten Linie. Der Messort im AFM Bild ist durch Pfeile gekennzeichnet. Der Bildausschnitt beträgt 500 x 500 nm mit einer Höhenskalierung von 8,6 nm auf 256 Graustufen. Die Messungen erfolgten im Tapping Mode (TM-AFM) bei RT.

Die Oberflächenmorphologie von Cyt c (N-his), das über den His Tag an eine NiNTA funktionalisierte Oberfläche gebunden war, wurde ebenfalls mittels AFM untersucht (Abbildung 5.30 und 5.31).

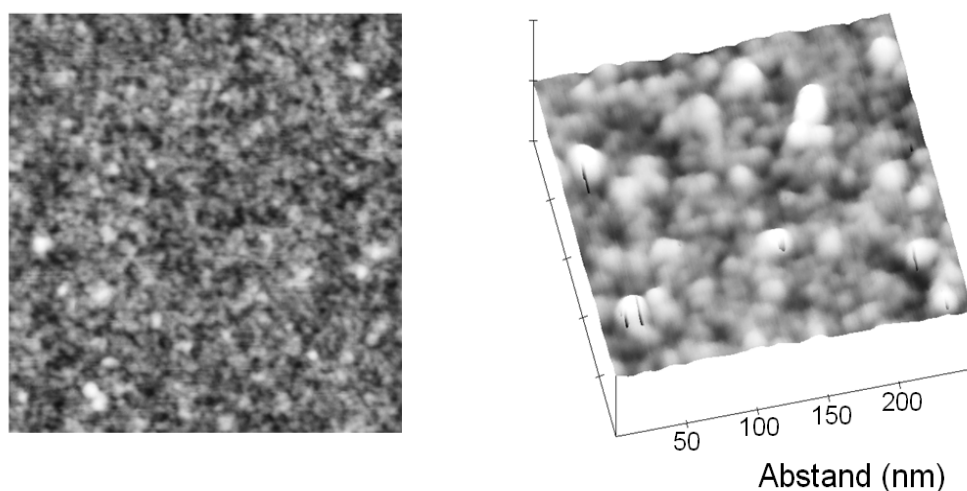


Abb. 5.30 TM-AFM Aufnahmen von auf NiNTA über den His Tag immobilisiertem Cyt c (N-his) in unterschiedlicher Darstellungsweise. Das AFM Bild links zeigt einen Bereich von 500 x 500 nm, mit einer Höhenskalierung von 10 nm auf 256 Graustufen.

Hierbei zeigte sich eine einheitliche Struktur, die auf eine homogene Oberflächenbedeckung mit His Tag immobilisiertem Cyt *c* schließen lässt. Insgesamt konnten kaum größere Strukturen entdeckt werden, die aus der Hintergrundstruktur hervorrugten und auf unspezifisch gebundenes Protein schließen lassen würden. Aufgrund der kompakten Struktur war eine Bestimmung der Strukturhöhe schwierig. An einer Defektstelle wurde ein Höhenprofil erstellt (Abbildung 5.31). Hierbei ergab sich eine vertikale Höhe der Hintergrundstruktur von 3,6 nm. Dieser Wert deckt sich sehr gut mit dem Durchmesser von Cyt *c* (3,4 nm). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Hintergrundstruktur um Cyt *c* handelte. Sehr vereinzelt konnten Strukturen beobachtet werden, die etwa 5 nm aus der Proteinschicht herausragten. Diese können vermutlich auf unspezifisch gebundene Cyt *c* Moleküle oder Kontaminationen mit Fremdproteinen zurückgeführt werden.

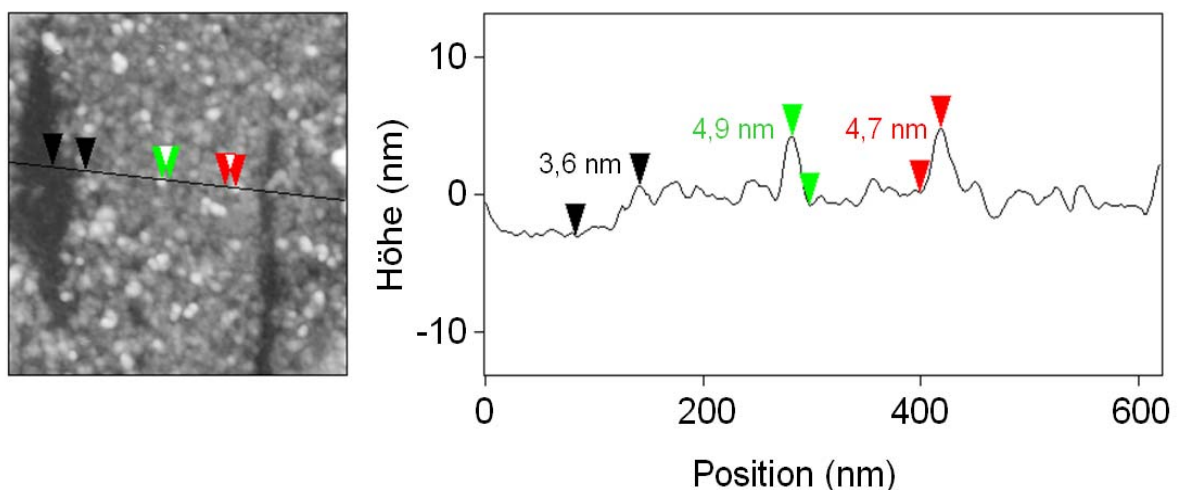


Abb. 5.31 TM-AFM Aufnahme von auf NiNTA immobilisiertem Cyt *c* (N-his) mit Höhenprofil entlang der eingezeichneten Linie. Der Messort im AFM Bild ist durch Pfeile gekennzeichnet. Der Bildausschnitt beträgt 618 x 618 nm, bei einer Höhenskalierung von 20 nm auf 256 Graustufen.

Nach Zugabe von Au Nanopartikeln auf His Tag immobilisiertes Cyt *c* (N-his), wurde erneut die Oberflächenmorphologie untersucht (Abbildung 5.32 und 5.33). Dabei zeigte sich eine deutliche Veränderung. Die zuvor einheitlich strukturierte Oberfläche war nun vollkommen mit annähernd kugelförmigen Strukturen bedeckt und zeigte deutliche Höhenunterschiede. In Abbildung 5.33 wurde ein Höhenprofil entlang einer Linie erstellt. Die kugelförmigen Strukturen zeigten sehr einheitliche vertikale Ausdehnungen von etwa 5 nm und hatten somit die Dimensionen der Au Nanopartikel. Aus den AFM Aufnahmen wurde eine Bedeckung von 80% bis 90% bestimmt. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Au Nanopartikel

elektrostatistisch an Cyt c binden und eine sehr dichte und homogene Schicht auf der Proteinmonolage ausbilden.

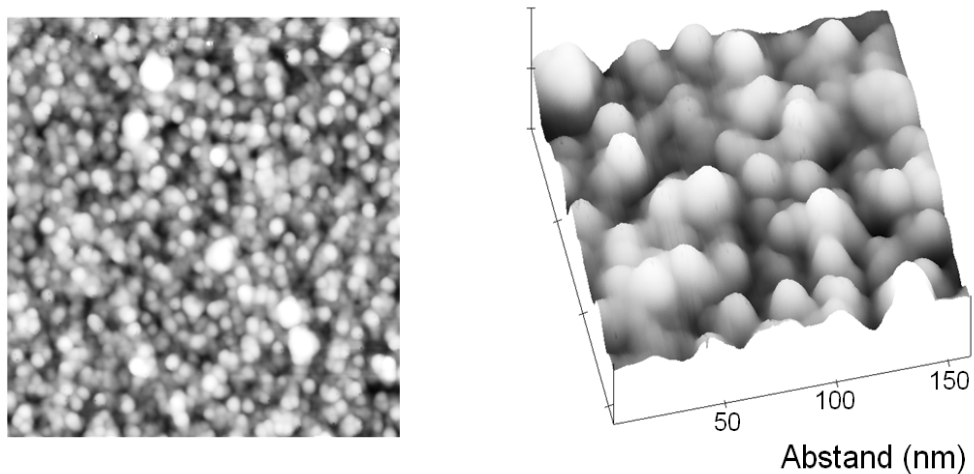


Abb. 5.32 TM-AFM Aufnahmen von Au Nanopartikeln auf His Tag immobilisiertem Cyt c (N-his) in unterschiedlicher Darstellungsweise. Der Bildausschnitt beträgt 500 x 500 nm, bei einer Höhenskalierung von 20 nm auf 256 Graustufen.

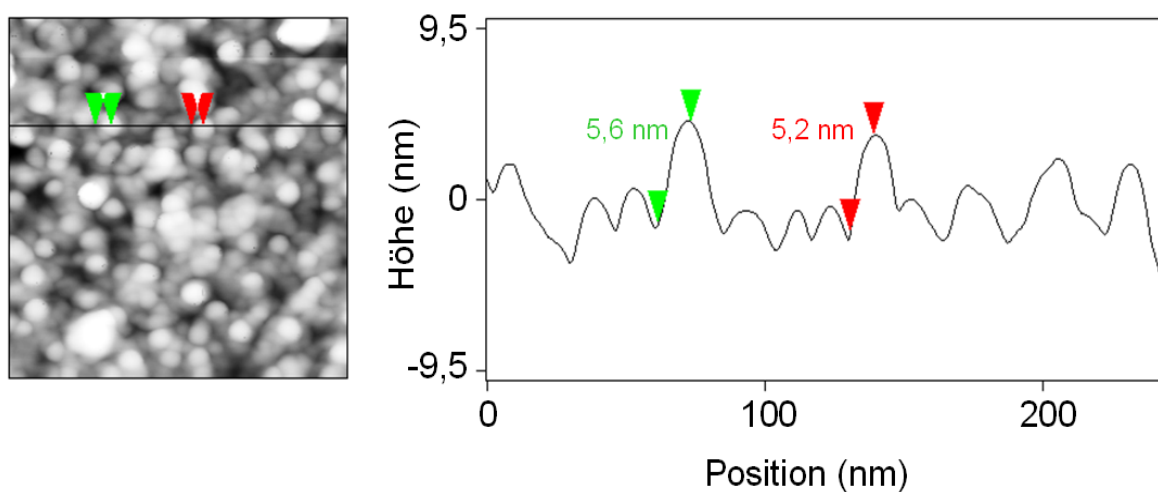


Abb. 5.33 TM-AFM Aufnahme von Au Nanopartikeln auf His Tag immobilisiertem Cyt c (N-his), mit Höhenprofil entlang der eingezeichneten Linie. Der Messort im AFM Bild ist durch Pfeile gekennzeichnet. Der Bildausschnitt beträgt 242,7 x 242,7 nm, bei einer Höhenskalierung von 20 nm auf 256 Graustufen.

Analog zu den His getaggtten Cyt c Varianten wurde die Immobilisierung von Cyt c (C-cys) mit Hilfe von SPR untersucht (Abbildung 5.34).

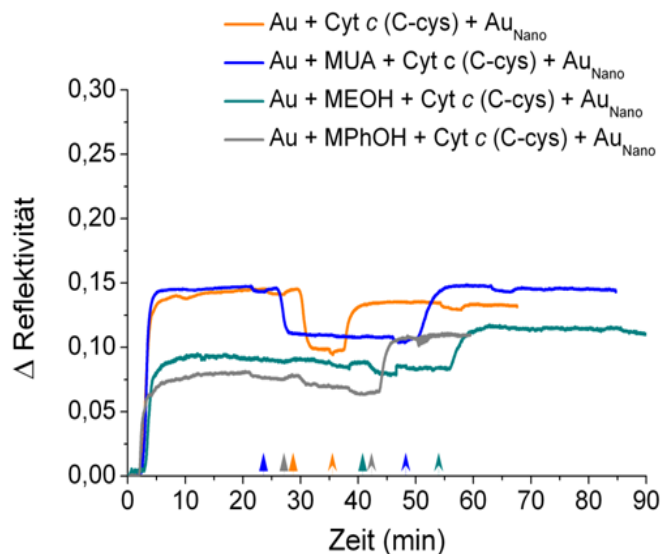


Abb. 5.34 SPR-Untersuchung der Immobilisierung von Cys getaggttem Cyt c (C-cys) auf beschichteten und unbeschichteten Au Oberflächen. Dargestellt ist die zeitliche Änderung der Reflektivität. Die Injektion der Cyt c Lösung erfolgte zum Zeitpunkt $t = 0$ min. Die Pfeile (▲) markieren den jeweiligen Zeitpunkt, von dem an mit Puffer gespült wurde. Die eingeschnittenen Pfeile (▲) markieren die Zugabe von Au Nanopartikel Lösung.

Cyt c (C-cys) wurde sowohl auf eine unbeschichtete Au Oberfläche, als auch auf eine mit Thioalkoholen beschichtete Au Oberfläche immobilisiert. In allen untersuchten Fällen kam es zu einer sehr schnellen Oberflächenanbindung, vergleichbar mit der elektrostatischen Anbindung auf MUA. Die Bindungsenergie zwischen Au und Schwefel ist sehr stark, sodass wie hier beobachtet, eine schnelle Bindungskinetik erwartet werden konnte. Auf der unbeschichteten Au Oberfläche kam es zu einem ähnlichen Effekt, wie er schon bei der elektrostatischen Immobilisierung beobachtet wurde. So ergab sich zunächst eine deutlich höhere Bedeckung mit Protein, von dem jedoch ein Großteil durch anschließendes Spülen mit Puffer wieder entfernt werden konnte. Es kam offenbar, ähnlich wie bei der elektrostatischen Immobilisierung, zu Wechselwirkungen zwischen immobilisierten und in Lösung befindlichen Proteinen. Der beobachtete Effekt könnte darauf zurückzuführen sein, dass es bei in Lösung befindlichen Cyt c (C-cys) Molekülen zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Cys Tags kommt. Hierbei können bis zu zwei Disulfidbrücken pro Tag ausgebildet werden, da jeder Tag zwei Cysteine enthält. Bei Kontakt mit der Au Elektrode kommt es zur Spaltung der Disulfidbrücken und zur Bindung der Thiolgruppe an die Au Oberfläche. Sind mehr als eine Disulfidbrücke vorhanden, so kann vermutet werden, dass einige der Disulfidbrücken erst zeitverzögert gespalten werden und sich vorübergehend

Aggregate an der Elektrodenoberfläche bilden. Beim Spülen mit Puffer verschiebt sich das chemische Gleichgewicht, wodurch die Dissoziation der Proteine, die nicht an die Au Oberfläche gebunden sind, begünstigt wird. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ergibt sich aus der Tatsache, dass Cyt c auch über die internen Cysteine an unbeschichtete Au Oberflächen binden kann (siehe Kapitel 5.1.2), wobei in diesem Fall von einer zumindest teilweisen Denaturierung ausgegangen werden muss. In diesem Fall käme es verstärkt zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den nicht an die Au Oberfläche gebundenen Cys Tags. Nach Zugabe von Au Nanopartikeln kam es hier ebenfalls zu einem zweiten Immobilisierungsereignis. Die Au Nanopartikel adsorbierten elektrostatisch an das über Cys an die Au Oberfläche gebundene Cyt c. Dabei kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass es auch zu Bindungsreaktionen zwischen freien Cys Tags und dem Au der Nanopartikel kommt. Um eine spezifische Bindung von Cyt c über den Cys Tag zu gewährleisten, wurde die Goldoberfläche vor Zugabe der Proteinlösung mit einer SAM aus Thioalkoholen beschichtet. Cyt c ist nicht in der Lage an Thioalkohole zu binden [Murgida und Hildebrandt 2001]. Es wurde Mercaptoethanol (MEOH) oder 4-Mercaoptophenol (MPhOH) verwendet, da diese aufgrund der kurzen Kohlenstoffkette bzw. des Aromaten für einen Elektronentransfer besonders vielversprechend erschienen. Darüber hinaus gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass es auf gemischten Monolagen mit Thioalkoholen zu einem guten Elektronentransfer zwischen Elektrode und immobilisiertem Cyt c kommen kann [Petrovic *et al.* 2005; Yue *et al.* 2008]. Die Ausbildung von Au-Schwefel-Bindungen zwischen dem Cys Tag und der Au Oberfläche sollte trotz der SAM aus Thioalkoholen erfolgen können. Um das zu gewährleisten enthielt der Cys Tag zwei Cysteine. Hierdurch ergab sich im Vergleich zu den Thioalkoholen eine etwa doppelt so hohe Bindungsaffinität zur Au Oberfläche. SAMs sind in der Regel nicht vollkommen homogen, sondern zeigen vor allem im Bereich der Domänengrenzen Defekte. Solche Defekte, die verstärkt bei kurzkettigen SAMs auftreten, ermöglichten die direkte Anbindung des Cys Tags. Die Gleichgewichtsreaktion, bei der das Gleichgewicht aufgrund der höheren Bindungsaffinität auf die Seite der Bindung zwischen Au und Cys Tag verschoben ist, führt schließlich zur Oberflächenimmobilisierung des Proteins. Die Zwischenräume bleiben jedoch mit Thioalkoholen bedeckt und verhindern die Bindung interner Cysteine an die Oberfläche. Abbildung 5.34 zeigt, dass es sowohl für MEOH, als auch MPhOH nach Zugabe des Proteins zu einer sehr schnellen und irreversiblen Anbindung an die Oberfläche kam. In beiden Fällen wurden ähnliche Oberflächenbedeckungen erreicht, die insgesamt etwas geringer als die von elektrostatisch immobilisiertem Cyt c erscheinen. Ein exakter Vergleich

ist aufgrund der unterschiedlichen SAMs schlecht möglich. Unspezifische Bindungen konnten in beiden Fällen nicht beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass die Cys Tags an die Au Oberfläche gebunden haben und es zu keiner Denaturierung von Cyt c kam. In einem zweiten Immobilisierungsschritt gelang es auch hier, Au Nanopartikel elektrostatisch an das bereits immobilisierte Protein zu binden. Um zu überprüfen, dass es tatsächlich, wie von [Murgida und Hildebrandt 2001] beschrieben, zu keiner hydrophilen Wechselwirkung zwischen der polaren Kopfgruppe der Thioalkohole und Cyt c kommt, wurde kommerzielles Cyt c anstelle von Cyt c (C-cys) verwendet und über eine MEOH SAM geleitet. Hierbei konnte keine vergleichbare Bindungsreaktion beobachtet werden. Ein interessantes Ergebnis zeigte sich bei elektrostatisch immobilisiertem Cyt c (C-cys) auf MUA nach Zugabe von Au Nanopartikeln (Abbildung 5.34). Hier konnte ein zweites Immobilisierungsereignis beobachtet werden, obwohl für elektrostatisch immobilisiertes kommerzielles Cyt c gezeigt wurde, dass sich Au Nanopartikel nicht gleichzeitig elektrostatisch an Cyt c binden lassen. Stattdessen wurde eine teilweise Desorption beobachtet. Dieses scheint hier nicht der Fall gewesen zu sein. Da der einzige Unterschied zwischen beiden Proteinvarianten in dem Cys Tag liegt, der frei zugänglich ist, kann die Adsorption der Au Nanopartikel nur mit dem Tag in Verbindung stehen. Zu vermuten ist eine Bindung des Cys Tags an die Au Nanopartikel. Diese waren zwar durch Zitrat stabilisiert, aufgrund der hohen Bindungsstärke des Cys Tags kann aber davon ausgegangen werden, dass es trotzdem zu Bindungsreaktionen an die Au Nanopartikel gekommen ist.

Mit Hilfe der SPR und AFM Versuche konnte gezeigt werden, dass sich alle rekombinanten Cyt c Varianten sowohl elektrostatisch an MUA, als auch über ihren spezifischen Affinitätstag an entsprechend funktionalisierte Au Oberflächen immobilisieren lassen. Durch anschließende Zugabe von Au Nanopartikeln wurde gezeigt, dass die rekombinanten Cyt c Varianten bifunktional immobilisiert werden können und simultan elektrostatisch und über ihren Affinitätstag Bindungen eingehen.

5.3.2 Redoxverhalten auf Au Elektroden

Die auf Au Elektroden immobilisierten Cyt c Varianten sollten mittels Zyklovoltammetrie auf ihre Redoxaktivität untersucht werden. Dabei galt es zu zeigen, dass ein Elektronentransfer sowohl bei elektrostatisch gebundenem Cyt c, als auch bei der Immobilisierung über den Affinitätstag erfolgen kann.

Elektrostatische Immobilisierung

Zunächst wurde die Redoxaktivität von rekombinantem Wt Cyt c mit der von nativem, kommerziell erhältlichem Cyt c verglichen. Hierzu wurden beide Varianten jeweils auf MUA beschichteten Au Elektroden immobilisiert und wie bereits zuvor für Cyt c beschrieben (siehe Kapitel 3.7.2 und Kapitel 5.1), das Zyklovoltammogramm aufgezeichnet (Abbildung 5.35).

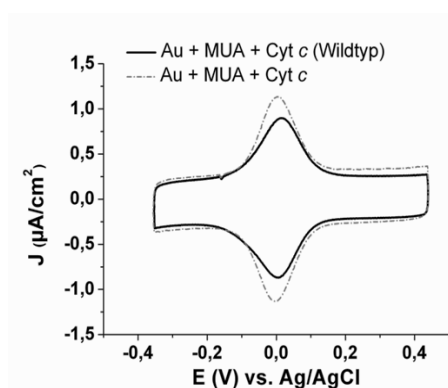


Abb. 5.35 Zyklovoltammogramme von kommerziellem Cyt c (unterbrochene Linie) und rekombinantem Wt Cyt c (durchgehende Linie), immobilisiert auf MUA in Phosphatpuffer ($I = 5,78$ mM, pH 7,0), bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s. Die Potentiale sind bezogen auf das Potential einer Ag/AgCl Referenzelektrode (3M KCl), als Gegenelektrode diente ein Platindraht.

Im direkten Vergleich der Zyklovoltammogramme zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Das Formalpotential von Wt Cyt c liegt mit 11 mV ziemlich genau bei dem Wert von kommerziellem Cyt c (0 mV). Auch die kapazitiven Anteile der beiden Zyklovoltammogramme sind nahezu identisch (Tabelle 5.6). Lediglich die Peakhöhe ist bei Wt Cyt c etwas geringer. Anstelle dessen, erscheint der Peak etwas verbreitert. Bei der Berechnung der Ladungsstromdichten aus den Flächenintegralen ergaben sich einheitliche Werte für Oxidation und Reduktion, die im Bereich der Ladungsstromdichten von kommerziellem Cyt c lagen (Tabelle 5.6). Hieraus ergab sich, dass die mit rekombinantem Wt Cyt c beschichtete Oberfläche zu etwa 56% mit redoxaktivem Cyt c bedeckt war. Bei

kommerziellem Cyt c wurde ein Bedeckungsgrad von 66% erreicht. Die UV/VIS spektroskopischen Untersuchungen hatten ergeben, dass nur etwa 40-60% der aufgereinigten Cyt c Moleküle mit Häm beladen sind. Nur diese vollständigen Häm-Proteine können einen Beitrag zur Flächenladungsdichte leisten. Geht man von gleich guten elektrostatischen Bindungseigenschaften des beladenen und unbeladenen Cyt c aus, so ist bei der Berechnung des Bedeckungsgrades aus der Flächenladungsdichte ein niedrigerer Wert zu erwarten. Verglichen mit den bei kommerziellem Cyt c erreichten Bedeckungsgraden, erscheint daher ein Wert von 56% sogar recht hoch.

In Abbildung 5.36 sind die Zyklovoltammogramme aller His getaggtten Cyt c Varianten in elektrostatisch immobilisiertem Zustand, im Vergleich zu kommerziellem Cyt c gezeigt.

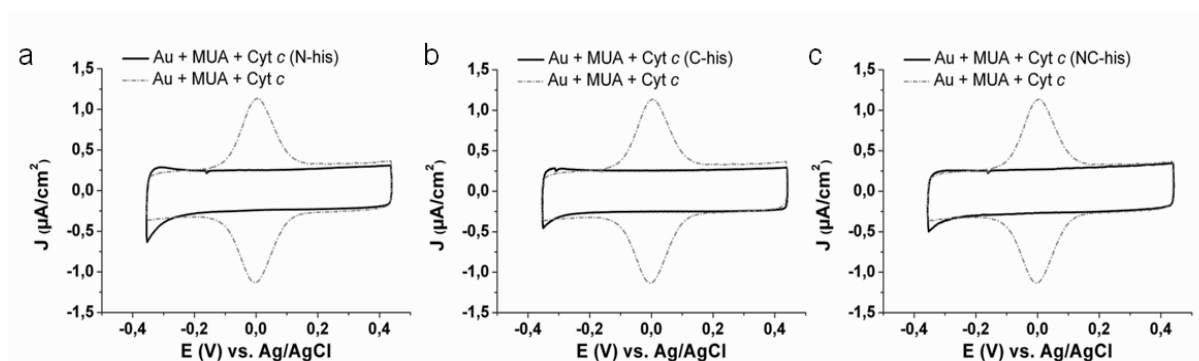


Abb. 5.36 Zyklovoltammogramme von kommerziellem Cyt c (unterbrochene Linie) und unterschiedlich rekombinantem Cyt c (durchgehende Linie), immobilisiert auf MUA beschichteten Au Elektroden in Phosphatpuffer ($I = 5,78$ mM, pH 7,0), bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s. Die Potentiale sind bezogen auf das Potential einer Ag/AgCl Referenzelektrode (3M KCl), als Genelektrode diente ein Platindraht. (a) Cyt c (N-his); (b) Cyt c (C-his); (c) Cyt c (NC-his).

Für keine dieser rekombinanten Proteine war ein Redoxpeak erkennbar. Auch Veränderungen der Standardimmobilisierungsbedingungen, wie pH-Wert oder Inkubationszeit, führten zu keiner messbaren Redoxaktivität. Offenbar steht der angehängte His Tag in direktem Zusammenhang mit dem Verlust der Redoxaktivität. Die SPR Untersuchungen haben gezeigt, dass es bei der elektrostatischen Immobilisierung aller His getaggtten Cyt c Varianten zu höheren Bedeckungen mit Protein kam. Zudem konnte mit Hilfe der UV/VIS Spektroskopie gezeigt werden, dass das rekombinante Cyt c in aktiver Form vorlag. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Oberfläche tatsächlich mit ausreichend aktivem Cyt c bedeckt war. Die höhere Oberflächenbedeckung weist auf eine geänderte Orientierung hin. Die AFM Aufnahmen zeigten eine inhomogene Oberflächenstruktur, was auf eine unvollständige Doppellage hindeutet. Eine Erklärung für

die geänderte Orientierung des Cyt *c* bei der Immobilisierung, sind geänderte Ladungszustände an der Proteinoberfläche. Bei Wt Cyt *c* kommt es durch die erhöhte Zahl von Lysinen im Bereich der teilweise exponiert liegenden Häm-Gruppe zu einem Dipol-ähnlichen Effekt, der zu einer definierten Anlagerung der Proteine im Bereich der Häm-Gruppe führt. Es ist zu vermuten, dass die zusätzliche positive Ladung des aus sechs Histidinen bestehenden Tags die Nettoladung von Cyt *c* so verändert, dass es zu einer anderen Orientierung an der Elektrodenoberfläche kommt. Hierdurch binden die Proteine zwar noch elektrostatisch, an der Bindung sind aber vermutlich andere als die in der Literatur beschriebenen Lys13, Lys72 und Lys86 beteiligt [Ataka *et al.* 2004B; Niki *et al.* 2003; Rieder und Bosshard 1980; Smith *et al.* 1977]. Durch den dabei entstehenden Abstand zwischen Elektrode und Eisenzentrum der Häm-Gruppe, kann es zu keinem Elektronentransfer kommen. Eine Strukturänderung von Cyt *c*, etwa durch Koordinierung des His Tags an die Häm-Gruppe und einen dadurch bedingten Verlust der Redoxaktivität, kann aufgrund des UV/VIS Spektrums ausgeschlossen werden. Nicht natürliche Häm-Histidin Ligationen führen zu einem veränderten Absorptionsspektrum [Nastri *et al.* 1998; Albrecht *et al.* 2005; Chen *et al.* 2007].

Um zu überprüfen, ob die Vermutung zutreffend ist, dass die Orientierung des Proteins zu einer für den Elektronentransfer zu großen Distanz führt, wurde der Abstand zwischen Elektrode und Protein durch Verwendung einer kurzkettigen SAM verringert. Abbildung 5.37 zeigt das Zyklovoltammogramm von Cyt *c* (C-his), elektrostatisch auf MPA immobilisiert.

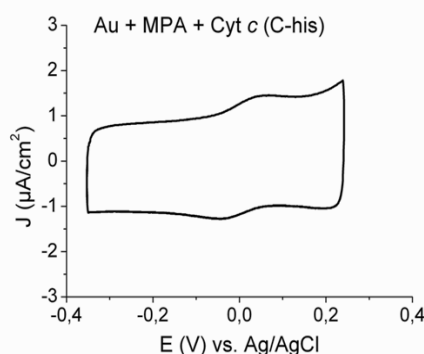


Abb. 5.37 Zyklovoltammogramm von Cyt *c* (C-his), elektrostatisch immobilisiert auf MPA in Phosphatpuffer ($I = 5,78$ mM, pH 7,0), bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s. Die Potentiale sind bezogen auf das Potential einer Ag/AgCl Referenzelektrode (3M KCl).

In diesem Fall war eine schwache Redoxaktivität zu beobachten, wobei die Potentialvorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s zu einer deutlich sichtbaren Peakseparation führte. Dieses deutet auf einen immer noch recht großen Abstand zwischen Elektrode und

Redoxzentrum hin (vergleiche 5.1). Das Formalpotential von -1 mV deckt sich hingegen sehr gut mit dem von kommerziellem Cyt c (Tabelle 5.6).

Tab. 5.6 Elektrochemische Daten für elektrostatisch immobilisiertes, kommerzielles und rekombinantes Cyt c auf unterschiedlichen SAMs, ermittelt bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s.

Protein	SAM	E_0 [mV]	σ_{Ox} [$\mu\text{C}/\text{cm}^2$]	σ_{Red} [$\mu\text{C}/\text{cm}^2$]	σ_m [$\mu\text{C}/\text{cm}^2$]	B_n [%]
Cyt c	MUA	0	1,11	1,07	1,09	66
Cyt c (Wt)	MUA	10	0,93	0,95	0,94	56
Cyt c (C-cys)	MUA	5	0,94	0,87	0,91	54
Cyt c (C-his)	MPA	-1	0,38	0,50	0,44	27
Cyt c	MPA	9	0,34	0,24	0,29	18

Aus den Flächenintegralen der beiden Peaks errechneten sich die Ladungsstromdichten (Tabelle 5.6) und daraus der Bedeckungsgrad B_n . Dieser liegt für Cyt c (C-his) auf MPA bei 27% und damit knapp 10% höher als für kommerzielles Cyt c bestimmt. Insgesamt war die Bedeckung mit redoxaktivem Protein jedoch deutlich geringer, im Vergleich zu Wildtyp Cyt c auf MUA. Diese Tatsache spricht dafür, dass trotz des reduzierten Abstandes nur ein Teil des His getaggten Cyt c einen Beitrag zum Elektronentransfer leisten kann. Ein Doppelpeak, wie bei den elektrochemischen Untersuchungen mit kommerziellem Cyt c auf MPA, wurde hier nicht beobachtet. His getaggttes Cyt c ist somit grundsätzlich redoxaktiv. Bei der elektrostatischen Immobilisierung kommt es aber vermutlich aufgrund sterischer Einflüsse des His Tags zu einer für den Elektronentransfer unvorteilhaften Orientierung des Proteins an der Elektrodenoberfläche.

Ein vergleichbarer Einfluss des Cys Tags konnte nicht beobachtet werden. Abbildung 5.38 a zeigt das Zykelvoltammogramm von elektrostatisch auf MUA immobilisiertem Cyt c (C-cys), im Vergleich zu kommerziellem Cyt c.

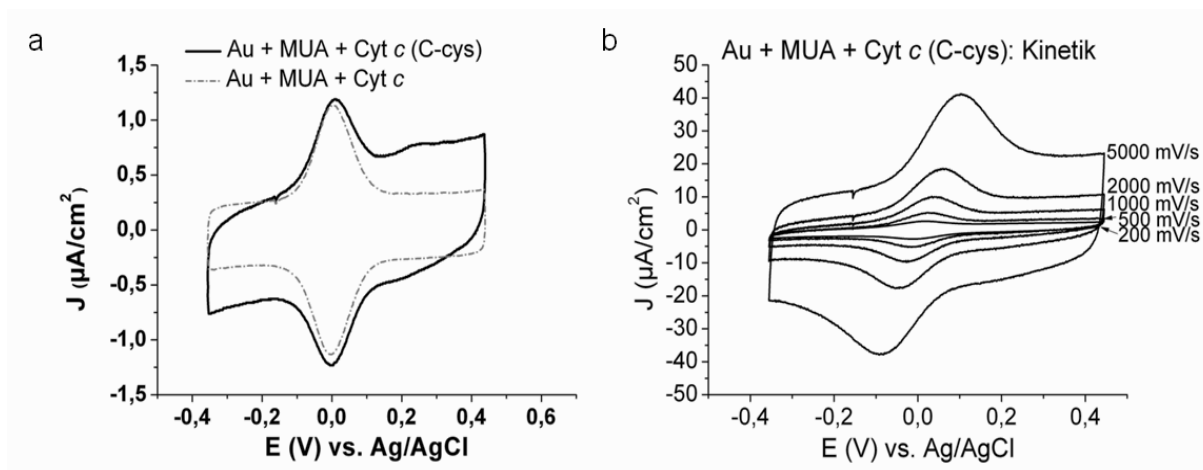


Abb. 5.38 Zyklovoltammogramme von Cyt c, elektrostatisch immobilisiert auf MUA (a) kommerzielles Cyt c (unterbrochene Linie) und Cyt c (C-cys) (durchgehende Linie), bei einer Potentialvorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s; (b) Cyt c (C-cys), bei Potentialvorschubgeschwindigkeiten von 200 mV/s, 500 mV/s, 1000 mV/s, 2000 mV/s und 5000 mV/s. Alle Potentiale wurden in 5,78 mM Phosphatpuffer pH 7,0 gemessen und sind bezogen auf das Potential einer Ag/AgCl Referenzelektrode (3M KCl), als Gegenelektrode diente ein Platindraht.

Das mit einem C-terminalen Cys Tag modifizierte Cyt c (C-cys) zeigte ein deutliches Redoxverhalten, wie anhand des ausgeprägten Redoxpeaks zu erkennen ist. Peakpotential und Form sind mit denen von kommerziellem Cyt c vergleichbar. Die aus den Flächenintegralen errechneten Ladungsstromdichten (Tabelle 5.6) ergaben für Oxidations- und Reduktionspeak ähnliche Werte. Es wurde ein Bedeckungsgrad von 54% ermittelt, der sich sehr gut mit dem von rekombinantem Wt Cyt c deckt. In Abbildung 5.38 a fällt auf, dass das Zyklovoltammogramm gegenüber dem von kommerziellem Cyt c leicht verkippt ist und einen erhöhten kapazitiven Stromanteil aufweist. Diese Effekte sind vermutlich auf Spuren von Sauerstoff im Elektrolyten zurückzuführen. Da sowohl für kommerzielles Cyt c, als auch für Cyt c (C-cys) die gleiche SAM verwendet wurde, sollte der Abstand zwischen Elektrode und Protein in beiden Fällen vergleichbar sein, auf keinen Fall jedoch kleiner. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Cyt c (C-cys) vereinzelt über den Cys Tag an die Au Oberfläche gebunden hat. Der Platzbedarf des Cys Tags an der Au Oberfläche ist aufgrund der zwei Cysteine größer, als der eines einzelnen MUA Moleküls, wodurch verstärkt Defekte in der SAM entstehen. Defektstellen führen ebenfalls zu einer höheren Kapazität der Doppelschicht.

Analog zu den Untersuchungen mit kommerziellem Cyt c wurden hier kinetische Messungen durchgeführt (Abbildung 5.38 b). Dabei zeigte sich die charakteristische Abhängigkeit

zwischen Vorschubgeschwindigkeit und Peakseparation. Um einen besseren Vergleich zu kommerziellem Cyt *c* zu ermöglichen, wurden die Peakpotentiale über der Vorschubgeschwindigkeit für MUA immobilisiertes, kommerzielles Cyt *c* und Cyt *c* (C-cys), sowie für MPA immobilisiertes, kommerzielles Cyt *c* und Cyt *c* (C-his) nach Laviron aufgetragen (Abbildung 5.39 a). Abbildung 5.39 b zeigt die Peakseparation in Abhängigkeit der Vorschubgeschwindigkeit.

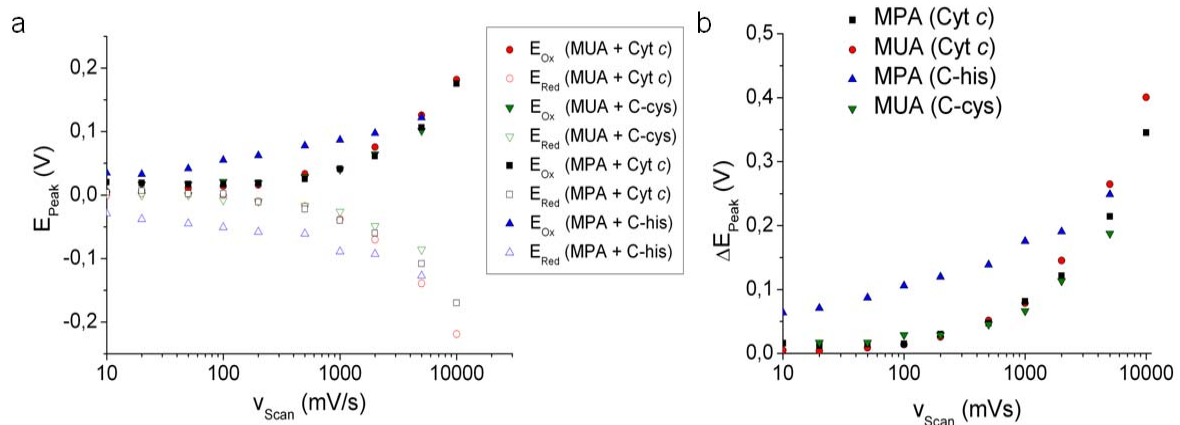


Abb. 5.39 Potentialverschiebung als Funktion der Potentialvorschubgeschwindigkeit nach Laviron (a) und als Peakpotentialdifferenz ΔE_{Peak} in Abhängigkeit von v_{Scan} (b). Gemessen wurde mit Potentialvorschubgeschwindigkeiten von 10 mV/s bis 5000 mV/s für rekombinantes Cyt *c* und bis 10000 mV/s für kommerzielles Cyt *c*.

Es zeigte sich, dass auf MUA immobilisiertes Cyt *c* (C-cys) eine annähernd identische Kinetik aufweist, wie kommerzielles Cyt *c*. Die Peakseparationen, in Abhängigkeit der Potentialvorschubgeschwindigkeit, war selbst bei 5000 mV/s annähernd identisch. In beiden Fällen errechnete sich ein Durchtrittsfaktor α von etwa 0,5 (Tabelle 5.7). Dies deutet auf einen symmetrischen Ladungstransfer hin. Auch die Standardgeschwindigkeitskonstante k_0 war in beiden Fällen beinahe identisch.

Tab. 5.7 Nach Laviron errechnete Werte für Durchtrittsfaktor α und Standardgeschwindigkeitskonstante k_0 .

Protein	SAM	α	k_0 [s ⁻¹]	Log k_0
Cyt <i>c</i>	MUA	0,453	13,2	1,1
Cyt <i>c</i> (C-cys)	MUA	0,500	12,2	1,1
Cyt <i>c</i> (C-his)	MPA	0,358	3,1	0,5
Cyt <i>c</i>	MPA	0,515	17,1	1,2

Ein deutlich anderes Bild ergab sich beim Vergleich von auf MPA immobilisiertem Cyt c. Während das kommerzielle Cyt c eine gegenüber MUA geringere Peakseparation zeigte, kam es bei dem His getaggtten Cyt c schon bei sehr niedrigen Vorschubgeschwindigkeiten zu einer starken Peakseparation, die mit zunehmender Scangeschwindigkeit linear anzusteigen schien. Hier zeigte sich keine Ähnlichkeit mit dem Kurvenverlauf von kommerziellem Cyt c auf MPA, stattdessen eine deutliche Ähnlichkeit zu dem Kurvenverlauf von Cyt c, das auf langkettigen Thioalkansäuren immobilisiert war (vergleiche Kapitel 5.1). Interessant ist dabei, dass der lineare Anstieg weniger steil ist, als bei MPDA oder MHDA. Dieses kinetische Verhalten von Cyt c (C-his) spricht dafür, dass der Elektronentransfer über eine größere Distanz erfolgte, als bei kommerziellem Cyt c auf MUA. Ursache hierfür ist wahrscheinlich die schon angesprochene unvorteilhafte Orientierung. So kommt es zu einer Elektronentransfercharakteristik, die sonst nur bei längerkettigen SAMs beobachtet wird. Dieses wird im Wesentlichen durch die sehr niedrige Standardgeschwindigkeitskonstante $k_0 = 3,1 \text{ s}^{-1}$ ($\text{Log } k_0 = 0,5$) bestätigt. Auch der Durchtrittsfaktor $\alpha = 0,358$ spricht für einen nicht optimalen Elektronentransfer.

Ein Vergleich der Standardgeschwindigkeitskonstanten unterschiedlich immobilisierter, rekombinanter Cyt c Varianten, mit auf Thioalkansäuren immobilisiertem kommerziellem Cyt c, findet sich in Abbildung 5.47 am Ende des Kapitels.

Tag Immobilisierung

Für die Untersuchung der Redoxaktivität von His Tag immobilisiertem Cyt c wurde die Elektrodenoberfläche, wie unter Kapitel 3.6.3 beschrieben, mit TSP, ANTA und NiSO_4 inkubiert. Hierdurch ergab sich eine mit NiNTA funktionalisierte SAM, auf der das rekombinante Protein mit dem His Tag binden konnte (Abbildung 5.40). Anschließend erfolgte die elektrochemische Charakterisierung des Redoxverhaltens für alle drei His getaggtten Varianten mittels Zyklovoltammetrie (Abbildung 5.41). Hierbei konnte in allen Fällen eine Redoxantwort beobachtet werden, wobei die Redoxpeaks von Cyt c (N-his) und Cyt c (NC-his) jedoch nur schwach ausgeprägt waren. Durch Subtraktion des kapazitiven Stromanteils ließen sich aber eindeutige Redoxpeaks identifizieren (Abbildung 5.41 b/d/f). Deutlich ausgeprägter war der Redoxpeak für Cyt c (C-his). Die Lage des His Tags hat offenbar einen deutlichen Einfluss auf das Redoxverhalten. Die Kombination zweier His Tags an N- und C-terminalen Ende führte zu keiner besseren Redoxaktivität. Vielmehr zeigte sich ein kleinerer Redoxpeak, als für den alleinigen C-terminalen His Tag.

Untersuchungen hierzu schlagen unterschiedliche Tunnelpfade vor [Wuttke *et al.* 1992; Langen *et al.* 1995]. Einer dieser Tunnelpfade endet in unmittelbarer Nähe des C-Terminus (Abbildung 5.42). In der Nähe des N-Terminus endet dagegen keiner der in der Literatur beschriebenen Tunnelpfade [Willner und Katz 2005]. Hierdurch ist ein effizienterer Elektronentransfer bei C-terminal immobilisiertem Cyt *c* zu erwarten.

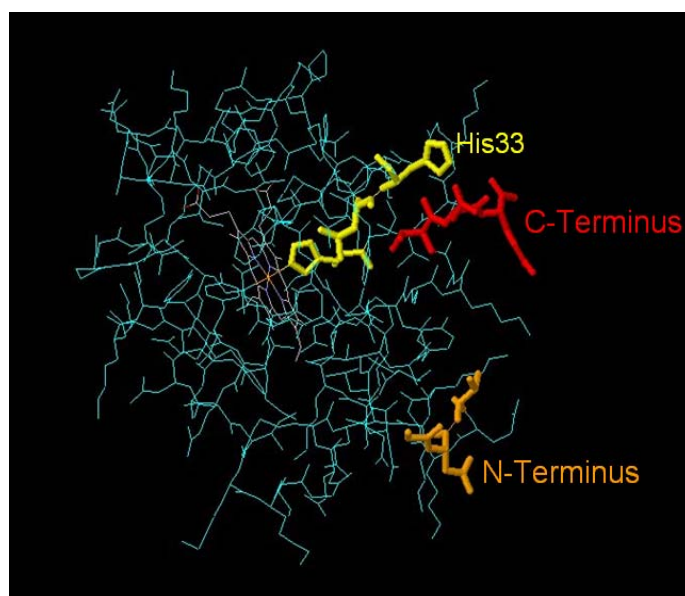


Abb. 5.42 Illustration eines der in der Literatur beschriebenen, bevorzugten Tunnelpfade durch Cyt *c* entlang von Aminosäuren mit aromatischen Seitengruppen. N- und C-Terminus sind farblich gekennzeichnet. Die 3D Struktur von Cyt *c* stammt aus der RCSB Protein Datenbank.

Aus Abbildung 5.41 wurden die Flächenintegrale gebildet und daraus die Ladungsstromdichten und Bedeckungsgrade errechnet (Tabelle 5.8). Auch die Formalpotentiale sind in Tabelle 5.8 angegeben.

Tab. 5.8 Elektrochemische Daten für His Tag immobilisiertes Cyt *c* auf NiNTA funktionalisierten Au Elektroden, ermittelt bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s.

Protein	E_{Ox} [mV]	E_{Red} [mV]	E_0 [mV]	σ_{Ox} [$\mu\text{C}/\text{cm}^2$]	σ_{Red} [$\mu\text{C}/\text{cm}^2$]	σ_m [$\mu\text{C}/\text{cm}^2$]	B_n [%]
Cyt <i>c</i> (N-his)	90	57	74	0,07	0,07	0,07	4
Cyt <i>c</i> (C-his)	76	32	54	0,21	0,20	0,20	12
Cyt <i>c</i> (NC-his)	78	40	59	0,13	0,08	0,11	6

Interessanterweise ergab sich für alle His getaggtten Cyt *c* Varianten ein deutlich positiveres Formalpotential, als für auf MUA elektrostatisch immobilisiertes Cyt *c*. Das Formalpotential war zwischen 50 und 75 mV verschoben. Auch bei der kovalenten Immobilisierung von

kommerziellem Cyt c wurde eine leichte Verschiebung des Formalpotentials festgestellt (vergleiche Kapitel 5.1.2). Offenbar hat die Art der Oberflächenanbindung Einfluss auf das Formalpotential. Bei ihren Untersuchungen zum Gating Prozess von immobilisiertem Cyt c, entdeckten [Murgida und Hildebrandt 2001; Rivas *et al.* 2002] einen strukturabhängigen Einfluss auf das Redoxpotential von Cyt c. Sie fanden heraus, dass neben dem beschriebenen Gating Prozess ein zweiter Effekt auftritt und beschreiben zwei unterschiedliche Konformationen B1 und B2 des Proteins. Bei B1 handelt es sich um die native Konformation, während es bei B2 zum Verlust der Koordination des Met80 an das Eisenzentrum kommt. Durch die Unterschiede in der koordinativen Bindung der Häm-Gruppe haben diese beiden Formen Einfluss auf den Elektronentransfer. Bei der elektrostatischen Bindung von Cyt c an eine SAM aus Thioalkansäuren, beobachteten [Murgida und Hildebrandt 2001] einen potentialabhängigen Übergang in der Häm-Koordination zwischen B1 und B2. Die nicht natürliche Form B2 führt zu einer deutlichen Herabsetzung des Redoxpotentials, im Vergleich zum Potential von Cyt c in Lösung. [Murgida und Hildebrandt 2001; Murgida und Hildebrandt 2008] vermuteten, dass es sich dabei um einen Mechanismus handelt, der verhindern soll, dass der in natürlicher Umgebung elektrostatisch an Cyt c Oxidase gebundene Elektronenüberträger (Cyt c) unmittelbar nach der Oxidation wieder reduziert wird. Das chemische Gleichgewicht zwischen nativer (B1) und nicht-nativer (B2) Konformation hängt stark vom elektrischen Feld am *Interface* ab. Dieses nimmt mit zunehmendem Abstand zur Elektrode ab, sodass bei Thioalkansäuren mit 10 oder mehr Methylgruppen die nicht-native Form kaum auftritt. Für kurzkettige Moleküle hingegen kann der Anteil auf über 75% ansteigen. Eine ähnliche strukturelle Gleichgewichtsreaktion konnte auch für die hydrophobe Immobilisierung von Cyt c beobachtet werden [Rivas *et al.* 2002]. In beiden Fällen liegt Cyt c in ähnlicher Orientierung vor [Murgida und Hildebrandt 2008], und die Häm-Gruppe hat direkten Kontakt zur SAM Oberfläche. Im Falle der Histidin Bindung von rekombinantem Cyt c kommt es sehr wahrscheinlich zu einer anderen Orientierung an der SAM. Dabei ist unklar, ob auch in diesem Fall eine Strukturänderung der Häm-Koordinierung analog zu den Beschreibungen von [Murgida und Hildebrandt 2008] stattfindet. Kommt es nicht oder nur eingeschränkt zur Bildung der nicht-nativen Form, so ist mit einem weniger stark herabgesetzten Redoxpotential zu rechnen, was die hier beobachteten, gegenüber der elektrostatischen Bindung von Cyt c, positiveren Potentiale erklären könnte. Analog kann diese Erklärung auch für die ebenfalls leicht verschobenen Formalpotentiale von kovalent gebundenem (siehe Kapitel 5.1.2) und auf langkettigen Thioalkansäuren immobilisiertem Cyt c herangezogen werden.

Vergleicht man die Peakpotentiale der His getaggtten Proteinen, so weichen diese recht stark voneinander ab, obwohl TSP mit daran gebundenem ANTA eine Moleküllänge vergleichbar mit MUA hat. Die Peakseparation bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s deutet auf einen größeren Abstand zwischen Elektrode und Redoxzentrum hin. Wie bereits erwähnt, kann nicht von einer konformalen Orientierung des Proteins wie bei der elektrostatischen Immobilisierung ausgegangen werden. Somit ergibt sich auch ein höherer mittlerer Abstand zwischen Elektrode und Häm-Gruppe. Ebenfalls nicht zu unterschätzen ist der bereits angesprochene intramolekulare Elektronentransfer, der ebenfalls einen Beitrag zum kinetischen Verhalten liefert. Für alle drei His getaggtten Proteine ergaben sich sehr geringe Bedeckungsgrade. Diese waren für Cyt c (N-his) und Cyt c (NC-his) mit 4% bzw. 6% besonders klein. Aber auch der Bedeckungsgrad mit Cyt c (C-his) war mit 12% sehr viel kleiner, als für elektrostatisch gebundenes Wt Cyt c. Sogar durch elektrostatische Anbindung von Cyt c (C-his) an MPA wurden höhere Bedeckungen erreicht. Die SPR und AFM Untersuchungen zeigten eine dichte Oberflächenbedeckung mit Protein. Somit ist der niedrige Bedeckungsgrad ausschließlich auf einen verringerten Elektronentransfer zurückzuführen. Unterschiedliche Anteile von Häm-beladenem und unbeladenem Cyt c alleine können den geringen Ladungstransfer nicht erklären. Stattdessen ist wahrscheinlich, dass es zu einer nicht vollkommen homogenen Orientierung der Proteine an der Oberfläche kam, und somit nur ein Teil der Moleküle nahe genug für einen Elektronentransfer an der Elektrodenoberfläche saß. Bei Cyt c (C-his) war der Ladungstransfer durch die Nähe des His Tags zu einem Elektronentransferpfad begünstigt, wodurch es bei mehr Molekülen zum Elektronentransfer kommen konnte und sich in der Folge ein größerer Bedeckungsgrad ergab.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass ein Elektronentransfer sowohl über den N-, als auch C-terminalen His Tag möglich ist. Dieser erfolgt über den C-terminalen His Tag aber deutlich effizienter. Die Effizienz des Elektronentransfers ist jedoch nicht mit der von elektrostatisch immobilisiertem Wt Cyt c vergleichbar.

Cyt c (C-cys), das über einen C-terminalen Cys Tag verfügt, lässt sich direkt an die Au Elektrodenoberfläche binden. Mittels Zyklovoltammetrie sollte überprüft werden, wie sich das Redoxverhalten gegenüber kommerziellem, direkt auf Au immobilisiertem Cyt c verändert (Abbildung 5.43).

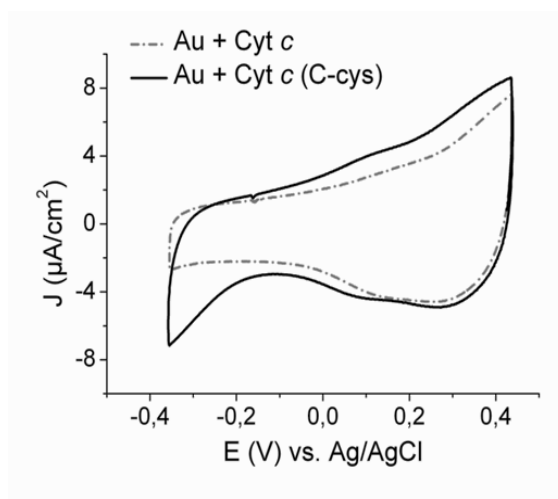


Abb. 5.43 Zyklovoltammogramm von kovalent auf Au(111) immobilisiertem, kommerziellem Pferdeherz Cyt c (unterbrochene Linie) und Cyt c (C-cys) (durchgehende Linie) in 5,78 mM Phosphatpuffer pH 7,0, bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s.

Hierbei zeigte sich für Cyt c (C-cys) ein ähnliches Zyklovoltammogramm wie für kommerzielles Pferdeherz Cyt c. Mit kommerziellem Cyt c ließ sich kein Elektronentransfer nachweisen. Im Gegensatz dazu, zeigte Cyt c (C-cys) einen schwachen Redoxpeak. Offenbar kam es zumindest bei einem Teil, der über den Cys Tag an die Au Oberfläche gebundenen Cyt c Moleküle, zu einem Elektronentransfer und entsprechend zur Oxidation und Reduktion des prosthetischen Eisenatoms. Bei kommerziellem Cyt c wurde davon ausgegangen, dass es bei der Bindung über die internen Cysteine zum Verlust der Häm-Gruppe kommt. Das ist bei Cyt c (C-cys) ebenfalls nicht auszuschließen. Die Bindungsaffinität des Cys Tags zur Au Oberfläche sollte aber aufgrund der zwei Cysteine begünstigt sein. Der hohe kapazitive Anteil im Zyklovoltammogramm erklärt sich, wie unter 5.1.2 beschrieben, aus dem direkten Kontakt zwischen Au Elektrode und Elektrolyt, da sich keine SAM dazwischen befindet.

Um Denaturierungsereignisse an der blanken Au Elektrode zu verhindern und den kapazitiven Stromanteil zu reduzieren, wurde die Au Oberfläche mit einer SAM aus Thioalkoholen beschichtet. Die Immobilisierung von Cyt c (C-cys) sollte, wie in Abbildung 5.44 schematisch dargestellt und unter 4.1.2 bzw. 5.3.1 diskutiert, durch Anlagerung des Cys Tags an die Au Oberfläche zwischen den Thioalkoholmolekülen erfolgen.

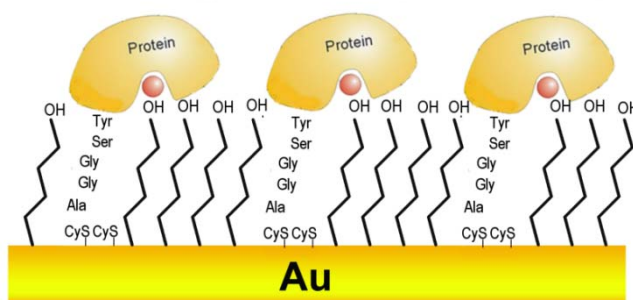


Abb. 5.44 Schematische Darstellung der Immobilisierung von Cys getaggttem, rekombinantem Cyt c auf einer Au Oberfläche, die mit einer SAM aus Thioalkoholen bedeckt ist.

In Abbildung 5.45 sind die Zyklovoltammogramme von Cyt c (C-cys) gezeigt, welches auf bzw. zwischen unterschiedlichen Thioalkoholen immobilisiert wurde. Da kurze SAM Moleküle, aufgrund des dadurch geringeren Abstandes zwischen Elektrode und Protein, einen besseren Elektronentransfer ermöglichen, wurden mit Mercaptoethanol (MEOH) und Mercaptopropanol (MPOH) sehr kurzketten Moleküle gewählt. Aromatische Moleküle sollten ebenfalls den Elektronentransfer begünstigen, auch wenn das für Mercaptobenzoessäure nicht eindeutig gezeigt werden konnte (vergleiche 5.1). Aus diesem Grunde wurde Mercatophenol (MPhOH) als dritte SAM Variante untersucht.

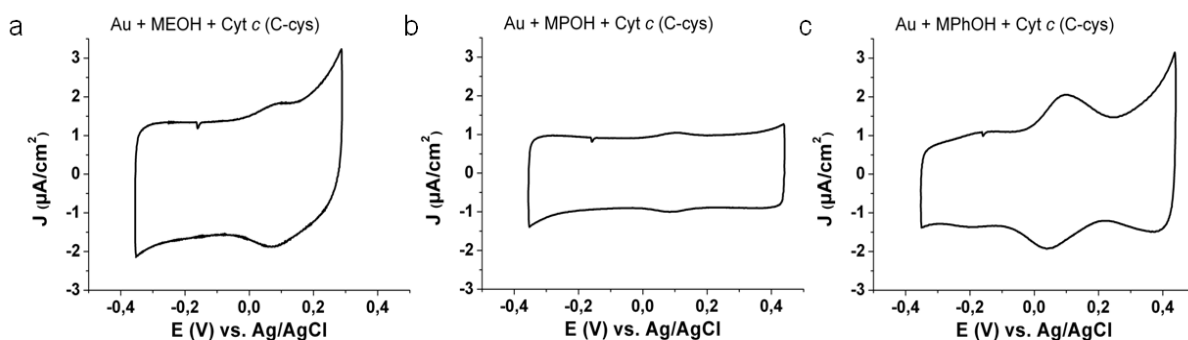


Abb. 5.45 Zyklovoltammogramme von rekombinantem Cyt c (C-cys) immobilisiert über den Cys Tag auf mit Thioalkoholen beschichteten Au Elektroden in Phosphatpuffer ($I = 5,78 \text{ mM}$, $\text{pH } 7,0$), bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s : (a) auf einer MEOH SAM; (b) auf einer MPOH SAM; (c) auf einer MPhOH SAM.

Auf allen drei SAMs kam es zu einem Elektronentransfer zwischen der Au Elektrode und dem immobilisierten Cyt c. Der Redoxpeak war jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. Am geringsten ausgebildet war der Peak auf MPOH. Ein deutlicheres, elektrochemisches Signal zeigte sich auf der SAM aus MEOH. Am deutlichsten ausgeprägt war der Redoxpeak von Cyt c (C-cys) auf MPhOH. Bei positiven Potentialen kam es sowohl bei MEOH, als auch bei

MPhOH zu einem Anstieg des kapazitiven Stromanteils. Hier ist eine Ähnlichkeit mit dem kapazitiven Anstieg bei direkt auf Au immobilisiertem Cyt c zu erkennen. Zu vermuten ist, dass dieser Effekt auf Defekten in der SAM beruht. Derartige Defekte werden durch die Cys Tag Anbindung des Proteins verstärkt, da bei der Bindung der zwei Cysteine an Au, Thioalkoholmoleküle von der Oberfläche entfernt werden. Dabei nimmt der Tag mehr Platz ein, als ein einziges Thioalkoholmolekül. In Tabelle 5.9 sind die aus den Zyklovoltammogrammen abgeleiteten elektrochemischen Daten für das Cys Tag immobilisierte Cyt c gezeigt.

Tab. 5.9 Elektrochemische Daten für Cys Tag immobilisiertes Cyt c (C-cys) auf unterschiedlichen Thioalkohole, ermittelt bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV/s.

SAM	E_{Ox} [mV]	E_{Red} [mV]	E_0 [mV]	σ_{Ox} [$\mu\text{C}/\text{cm}^2$]	σ_{Red} [$\mu\text{C}/\text{cm}^2$]	σ_m [$\mu\text{C}/\text{cm}^2$]	B_n [%]
MEOH	89	71	80	0,36	0,65	0,50	30
MPOH	106	87	97	0,16	0,14	0,15	9
MPhOH	98	39	69	1,45	1,07	1,26	75

Auch hier zeigte sich, ähnlich wie bei der His Tag Immobilisierung und der kovalenten Immobilisierung von Cyt c, eine Verschiebung des Formalpotentials E_0 . Dabei ergaben sich größere Schwankungen. E_0 lag etwa zwischen 70 mV und 100 mV und war somit deutlich gegenüber dem normalen Formalpotential von Cyt c verschoben. Dieses deutet auf eine geänderte Orientierung des Proteins in Abhängigkeit von Moleküllänge und Beschaffenheit der SAM hin. Analog zu den Beobachtungen bei kovalent und His Tag gebundenem Cyt c, kann eine veränderte Oberflächenanbindung zu einer Änderung der Koordinierung zwischen Apocytochrom c und Häm-Gruppe führen und so das Formalpotential beeinflussen [Murgida und Hildebrand 2001; Rivas *et al.* 2002]. Insgesamt fällt auf, dass die elektrochemischen Daten, die aus dem Oxidations-, bzw. Reduktionspeak ermittelt wurden, voneinander abweichen. Es zeigte sich bei den Redoxpotentialen eine deutliche Peakseparation. Für MEOH und MPOH war die Separation vergleichbar, wohingegen sie für MPhOH sehr viel größer ausfiel. Auch die errechneten Flächenladungsdichten für Hin- und Rückscan weichen, mit Ausnahme der Werte für MPOH, sehr viel stärker voneinander ab, als bei kommerziellem Cyt c auf Thioalkansäuren. Interessanterweise lag der errechnete Bedeckungsgrad mit redoxaktivem Protein vergleichsweise hoch. Lediglich bei einer SAM aus MPOH war ein sehr niedriger Bedeckungsgrad zu beobachten. Bei MEOH als SAM ergab sich ein Bedeckungsgrad mit redoxaktivem Cyt c von 30% und bei MPhOH sogar von 75%, der über

dem Wert von elektrostatisch immobilisiertem Cyt c liegt (siehe 5.1). In der Literatur wird zwar von Bedeckungsgraden bis 81% für Cyt c auf MUA berichtet [Salomon 2005], bei den hier verwendeten rekombinanten Proteinchargen muss aber von einem Anteil zwischen 40% und 60%, der nicht mit Häm beladenen Form von Cyt c ausgegangen werden. Eine Hypothese wäre, dass es in der Cyt c Lösung zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Cys Tags und internen Cysteinen des Apocytochrom c kommt. Da hier die Häm-Gruppe fehlt, sind die internen Cysteine ungebunden. Es ist vorstellbar, dass der Cys Tag aufgrund seiner hydrophoben Basis innerhalb des Proteins binden kann. Bindet der Cys Tag eines unbeladenen Cyt c Moleküls an die eigenen internen Cysteine, so kann dieses Molekül nicht mehr an die Oberfläche binden. Durch Bindung eines Cys Tags an ein internes Cys eines benachbarten Cyt c Moleküls, können Dimere entstehen, die die Anzahl freier Cys Tags reduzieren und somit einen Großteil des nicht mit Häm beladenen Cyt c binden. Zwar kommt es vermutlich auch zur Bildung von Dimeren zwischen Cys Tags unterschiedlicher Cyt c Moleküle, diese Disulfidbrücken können jedoch leicht wieder gespalten werden, da die Tags exponiert liegen und mit der Elektrodenoberfläche interagieren. Somit würden mehr mit Häm beladene Proteine an die Elektrodenoberfläche binden, als es dem Verhältnis in Lösung entspricht, was zu einer größeren Oberflächenbedeckung mit redoxaktivem Protein führt. Die deutlichen Unterschiede in der Oberflächenbedeckung, in Abhängigkeit der SAM, lassen sich hiermit jedoch nicht erklären. In allen Fällen wurde die gleiche Proteincharge verwendet und mittels SPR die effiziente Immobilisierung an die mit Thioalkohlen bedeckte Au Oberfläche gezeigt (Kapitel 5.3.1). Die starken Unterschiede lassen sich am ehesten mit einer für den Elektronentransfer unterschiedlich geeigneten Orientierung des rekombinanten Proteins erklären. Um Aussagen über den Elektronentransfer treffen zu können, wurden wie zuvor kinetische Untersuchungen mit allen Tag immobilisierten Proteinen durchgeführt. Abbildung 5.46 a/b zeigt die dabei festgestellte Abhängigkeit zwischen Peakpotential und Potentialvorschubgeschwindigkeit. Aus dem Diagramm nach [Laviron 1979] (Abbildung 5.46 a) wurden die Durchtrittsfaktoren α und die Standardgeschwindigkeitskonstanten k_0 berechnet (Tabelle 5.10). Ein Vergleich der Standardgeschwindigkeitskonstanten zwischen kommerziellem und rekombinatem Cyt c, in Abhängigkeit von der Kettenlänge der SAM, ist in Abbildung 5.47 gezeigt. Bei der Peakseparation, in Abhängigkeit der Scangeschwindigkeit, zeigte sich für Cyt c (C-cys) auf MEOH und MPOH ein fast identisches Verhalten. Erwartungsgemäß war die Peakseparation für MEOH am geringsten. MPOH besitzt ein C-Atom mehr, wodurch es zu einer minimal stärker ausgeprägten

Peakseparation kommt. In beiden Fällen deutet ein Durchtrittsfaktor von etwa 0,5 auf einen symmetrischen Elektronentransfer hin.

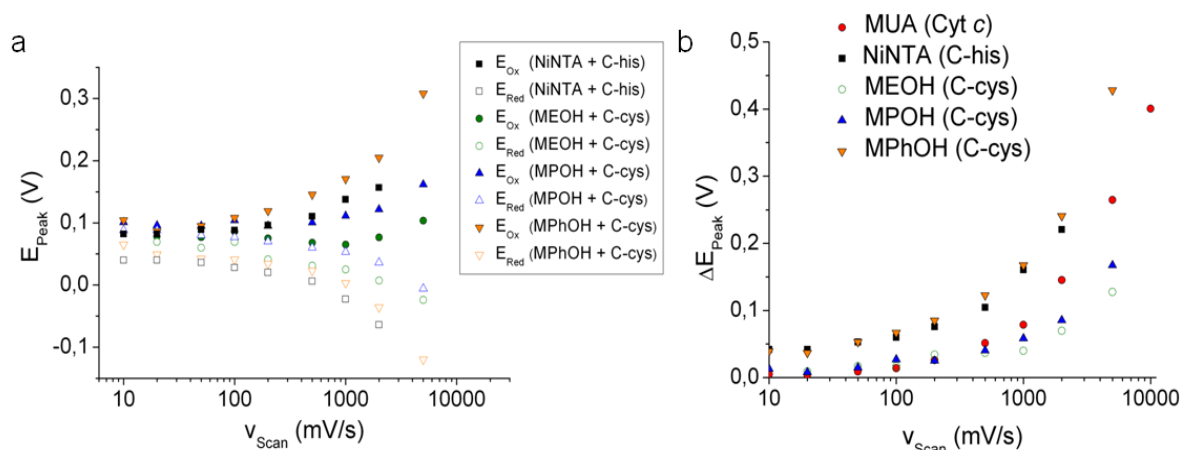


Abb. 5.46 Potentialverschiebung als Funktion der Potentialvorschubgeschwindigkeit nach Laviron (a) und als Peakpotentialdifferenz ΔE_{Peak} in Abhängigkeit von v_{Scan} (b). Gemessen wurde mit Potentialvorschubgeschwindigkeiten von 10 mV/s bis 10000 mV/s (bis 2000 mV/s für Cyt c (C-his) auf NiNTA bzw. bis 5000 mV/s für Cyt c (C-cys) auf MEOH).

Tab. 5.10 Nach Laviron errechnete Werte für Durchtrittsfaktor α und Standardgeschwindigkeitskonstante k_0 .

Protein	SAM	α	k_0 [s ⁻¹]	Log k_0
Cyt c (C-his)	TSP + NiNTA	0,250	3,2	0,5
Cyt c (C-cys)	MEOH	0,445	34,7	1,5
Cyt c (C-cys)	MPOH	0,486	18,5	1,3
Cyt c (C-cys)	MPhOH	0,526	6,0	0,8

Ein Vergleich der Standardgeschwindigkeitskonstanten mit denen von elektrostatisch auf kurzkettigen Thioalkansäuren immobilisiertem Cyt c zeigt ein konsistentes Bild. Wie in Abbildung 5.47 zu sehen ist, ergaben sich für MPA und MPOH annähernd identische Log k_0 Werte. Für das kürzerkettige MEOH ließ sich nur eine sehr geringe Steigerung der Standardgeschwindigkeitskonstante beobachten. Der ermittelte Log k_0 Wert bestätigt den bereits beschriebenen Sättigungseffekt für sehr kurzkettige SAM Moleküle. Daraus lässt sich auch schließen, dass der Elektronentransfer im Falle einer MEOH bzw. MPOH SAM durch die Thioalkohole erfolgt und nicht entlang des Cys Tags. Dieser besteht aus insgesamt 7 Aminosäuren, woraus sich eine für die Elektronen zu überwindende Kettenlänge von 18-21 Atomen ergibt, in Abhängigkeit davon, welches Cystein an die Oberfläche gebunden

ist. Somit wäre im Falle eines Elektronentransfers über den Cys Tag, unter der Annahme eines mit Thioalkansäuren vergleichbaren Tunneltransports, eine deutlich stärker ausgeprägte Peakseparation und Standardgeschwindigkeitskonstanten in der Größenordnung langkettiger Thioalkansäuren ($n_{\text{C-Atome}} > 11$) zu erwarten. Obwohl beim Elektronentransfer durch MPhOH nur ein C-Atom mehr überwunden werden muss als bei MPOH, ist hier eine viel ausgeprägtere Peakseparation zu erkennen. Diese übertrifft die Peakseparation von auf MUA immobilisiertem Cyt c deutlich (Abbildung 5.46). Stattdessen ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit dem elektrostatisch auf MPA immobilisierten, His getaggtten Cyt c. Auch die Standardgeschwindigkeitskonstante liegt, wie die des His getaggtten Cyt c, sehr viel niedriger als sich anhand der Erfahrungen mit Thioalkansäuren erwarten ließe (Abbildung 5.47). Trotzdem konnte für Cys Tag immobilisiertes Cyt c auf MPhOH das am stärksten ausgeprägte Redoxverhalten und die größte Bedeckung beobachtet werden.

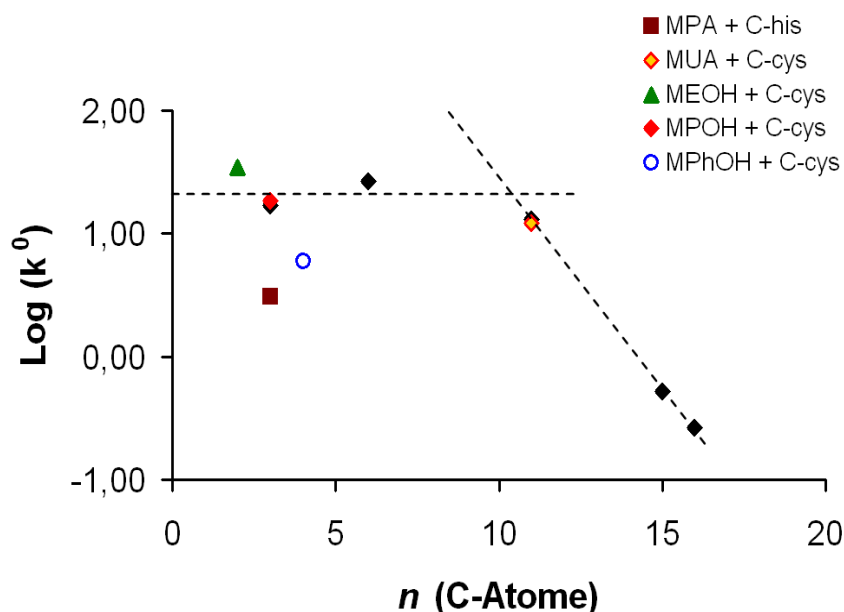


Abb. 5.47 Logarithmische Darstellung der ermittelten Standardgeschwindigkeitskonstanten k_0 , als Funktion der Anzahl von C-Atomen $n_{\text{C-Atome}}$ in der Thioalkansäure SAM (schwarze Punkte). Farblich gekennzeichnet sind die $\text{Log } k_0$ Werte von rekombinantem Cyt c, auf unterschiedlichen SAMs immobilisiert. Unterbrochene Linien illustrieren den linearen Zusammenhang für $n_{\text{C-Atome}} \geq 11$ und den Sättigungseffekt bei kurzkettingen SAMs.

Auf MPhOH kam es offenbar zu einem effizienten, aber langsamen Elektronentransfer. Für His getaggttes Cyt c wurde bereits diskutiert, dass die langsamere Kinetik auf einen größeren Abstand zwischen Elektrode und Redoxzentrum, in Folge einer geänderten Orientierung,

hinweist. Hierbei sind zwei Effekte zu unterscheiden. Zum einen bestimmt die Ausrichtung des Proteins den Abstand zur Elektrode und somit die Kinetik. Je geringer der Abstand, desto schneller die Kinetik und desto höher die Standardgeschwindigkeitskonstante. Bei sehr geringen Abständen wird die Kinetik des Elektronentransfers nur noch von dem von [Avila *et al.* 2000; Murgida und Hildebrandt 2001] beschriebenen potentialabhängigen Gating-Effekt bestimmt. Der zweite Effekt, der sich aus der Orientierung des Proteins ergibt, führt zu den unterschiedlichen Bedeckungsgraden mit redoxaktivem Protein. Die Bindung über einen einzelnen Tag lässt gegenüber der elektrostatischen Anbindung mehr Rotationsfreiheitsgrade zu, wodurch es zu einer uneinheitlichen Orientierung der Proteine kommt. Dabei ergeben sich unterschiedliche Abstände zwischen Elektrode und Protein, je nach Orientierungszustand. Ist einer dieser Abstände zu groß für einen Elektronentransfer, so können die in dieser Anordnung immobilisierten Proteine keinen signifikanten Beitrag mehr zum Redoxprozess leisten. In Folge dessen sinkt die Flächenladungsdichte, aus der sich der Bedeckungsgrad errechnet. Beide Effekte können parallel auftreten. So zeigte sich für Cyt *c* (C-cys) auf MEOH und MPOH eine schnelle Kinetik, aber nur ein relativ geringer Bedeckungsgrad. Dieses deutet darauf hin, dass ein Teil der Proteine sehr dicht an der Elektrodenoberfläche liegt, es aber zudem andere Orientierungen gibt, die keinen Elektronentransfer zulassen. Bei MPhOH kommt es offenbar zu einer homogenen Orientierung von Cyt *c*, sodass es im Mittel zu mehr Elektronentransferreaktionen pro Elektrodenfläche kommen kann. Dafür ist die Kinetik aber deutlich langsamer, was im Mittel auf einen in dieser Orientierung vergrößerten Abstand zwischen Elektrodenoberfläche und Redoxzentrum hinweist, verglichen mit der elektrostatischen Immobilisierung. Ähnlich dürfte es bei His getaggttem Cyt *c* sein, wobei hier deutlich geringere Redoxaktivität beobachtet wurde, was wiederum auf eine uneinheitliche Orientierung hinweist. Es wurden Untersuchungen mit unterschiedlichen SAMs durchgeführt, die belegen, dass die Orientierung von Cyt *c* auf der SAM Oberfläche von entscheidender Bedeutung für den Elektronentransfer ist [Allen *et al.* 1984; Ataka *et al.* 2004B; Imabayashi *et al.* 2005; Sagara *et al.* 2006]. Genauerer Aufschluss über den Einfluss der Orientierung von getaggttem Cyt *c* auf den Elektronentransfer könnten Messungen z.B. auf gemischten Monolagen, sowie spektroskopische Untersuchungen wie *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* oder Fourier-Transformations-IR-Spektroskopie liefern.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass mit allen rekombinanten Cyt *c* Varianten, sowohl elektrostatisch, als auch über den Affinitätstag immobilisiert, ein Elektronentransfer zwischen Elektrode und Protein nachgewiesen werden konnte. Redoxverhalten und Kinetik waren

unterschiedlich gut ausgeprägt, die besten Ergebnisse wurden mit Cyt c (C-cys) erzielt. Dieses zeigte, im Vergleich zu Wt Cyt c, in elektrostatisch gebundenem, sowie über den Cys Tag gebundenem Zustand, das höchste Redoxsignal. Bei der Immobilisierung von Cyt c mittels Affinitätstag gilt es, den besten Kompromiss zwischen Kinetik und Redoxsignal zu finden. Grundsätzlich führen kurze SAM Moleküle zu einer schnellen Kinetik, aber einer undefinierteren Orientierung, da das Tag immobilisierte Protein viele Rotationsfreiheitsgrade aufweist. Eine SAM längerer Moleküle schränkt die freie Beweglichkeit des Tag gebundenen Proteins ein und führt zu einer definierteren Orientierung. In diesem Fall ergibt sich jedoch eine langsamere Elektronentransferkinetik.

In einem bioelektronischen Bauelement muss der Einfluss der Orientierung neu bewertet werden, da dort eine zweite Koordinationsstelle zur Verfügung steht. Wird das Protein über zwei separate Bindungsstellen mit den räumlich getrennten Elektroden verankert, so ist dessen Orientierung eindeutig festgelegt. In dieser Bindungskonfiguration sind die Bewegungsfreiheitsgrade der Tags deutlich eingeschränkt. Somit wäre die Kinetik des Ladungstransfers der entscheidende Parameter bei der Auswahl der Tags.

5.3.3 Elektroenzymatische Reaktion mit Cytochrome c Reduktase / Oxidase

Der Elektronentransfer zwischen Elektrode und darauf immobilisiertem rekombinantem Cyt c konnte in elektrostatisch gebundenem Zustand nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass ein Elektronentransfer zwischen Elektrode und Affinitätstag gebundenem Cyt c stattfindet. Für eine Immobilisierung zwischen zwei Elektroden ist zwingend erforderlich, dass der Elektronentransfer durch Cyt c erfolgen kann, welches bifunktional gebunden ist. Es sollte im Folgenden gezeigt werden, dass ein Elektronentransfer durch simultan elektrostatisch und Tag gebundenes Cyt c möglich ist. Die natürlichen Reaktionspartner von Cyt c, Cyt c Oxidase und Cyt c Reduktase binden ebenfalls elektrostatisch an Cyt c [Dickerson und Timkovich 1975]. Dabei wird angenommen, dass in beiden Fällen dieselben Lysingruppen an der Bindung beteiligt sind [Smith *et al.* 1976]. Nach erfolgter Bindung zwischen Enzym und Cyt c, kommt es zum Elektronentransfer und entsprechend zur Oxidation (Cyt c Oxidase) oder Reduktion (Cyt c Reduktase) von Cyt c. Der Elektronentransfer durch Cyt c, das über einen Tag an eine Elektrodenoberfläche gebunden ist, und damit die funktionelle Integrität, sollte über eine elektroenzymatische Reaktion nachweisbar sein. Mittels photochemischem Enzymtest wurde bereits gezeigt, dass alle rekombinanten Cyt c Varianten in Lösung von Cyt c Reduktase reduziert werden (4.5). In der

Literatur wird eine Vielzahl von elektroenzymatischen Reaktionen beschrieben [Leger und Bertrand 2008; Willner und Katz 2005]. Dabei wurde jedoch fast immer das Redoxenzym an die Elektrodenoberfläche gebunden, und das Substrat befand sich in Lösung. Die enzymkatalysierte Oxidation oder Reduktion des Substrates konnte elektrochemisch durch einen hohen elektrokatalytischen, anodischen oder kathodischen Strom detektiert werden [Willner *et al.* 1996; Bardea *et al.* 1997; Zayats *et al.* 2002; Raitman *et al.* 2002; Diao *et al.* 2002; Katz *et al.* 2004B; Ataka *et al.* 2004A; Leger und Bertrand 2008]. In dem hier beschriebenen Fall, sollte das gebundene Cyt *c* von einem in Lösung befindlichem Enzym umgesetzt werden. Ein Beispiel für elektrodengebundene Häm-Proteine, die von einem in Lösung befindlichen Enzym, der Nitratreduktase, elektrochemisch oxidiert werden, wurde von [Willner *et al.* 1999] beschrieben. Für immobilisiertes Cyt *c* sind die Arbeiten von [Haas *et al.* 2001; Heering *et al.* 2004] besonders interessant. Dort wurden unterschiedliche Konstellationen von immobilisiertem Cyt *c* und Cyt *c* Oxidase, in Bezug auf die elektroenzymatische Interaktion beider Reaktionspartner untersucht. Hierbei zeigten [Haas *et al.* 2001], dass es zwischen elektrostatisch immobilisiertem Cyt *c* und in Lösung befindlicher Cyt *c* Oxidase zu keiner elektroenzymatischen Reaktion kommt. Da die Bindedomäne des Cyt *c* zur Elektrodenunterseite weist, ist keine Anlagerung des Enzyms möglich. Es kommt ebenfalls zu keinem Elektronentransfer zwischen Elektrode und direkt auf der Oberfläche adsorbierter Oxidase. Eine elektroenzymatische Reaktion bzw. ein Elektronentransfer zwischen Elektrode und Oxidase durch Cyt *c*, konnte nur für einen Komplex bestehend aus Oxidase und Cyt *c* nachgewiesen werden. In diesem Falle wurden Oxidase und Cyt *c* vor der Immobilisierung zusammengefügt und dieser Komplex anschließend an der Elektrode immobilisiert. Diese Untersuchungen von [Haas *et al.* 2001] zeigten, dass für einen Elektronentransfer zwischen Cyt *c* und Oxidase, das Enzym elektrostatisch an die Bindedomäne von Cyt *c* im Bereich der exponiert liegenden Häm-Ecke [Dickerson und Timkovich 1975] binden muss. In natürlicher Umgebung dient Cyt *c* als Elektronenshuttle zwischen den Transmembranproteinen Cyt *bc₁* (Cyt *c* Reduktase) und Cyt *c* Oxidase. Neben der Oxidase, bietet sich somit auch die Cyt *c* Reduktase für *in vitro* Untersuchungen des Ladungstransfers an. Dabei kommt es zum Elektronentransfer von NADH über die Cyt *c* Reduktase auf Cyt *c*. Die enzymatische Reaktion zwischen Cyt *c* und Cyt *c* Reduktase wurde bereits zur Untersuchung der Funktionalität des rekombinant hergestellten Cyt *c* *in vitro* benutzt (siehe Kapitel 4.5). Im Folgenden sollte geprüft werden, ob auch auf einer Au Elektrode immobilisiertes Cyt *c* von der Reduktase reduziert werden kann und es somit zu einem Elektronentransfer zwischen beiden Proteinen kommt. Der bei einer

elektroenzymatischen Reaktion erfolgende Elektronentransfer sollte elektrochemisch mittels Zyklovoltammetrie detektiert werden. Abbildung 5.48 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Zunächst wurde dabei geprüft, ob eine Reaktion zwischen elektrostatisch immobilisiertem kommerziellem Cyt c und Reduktase möglich war (Abbildung 5.48 a).

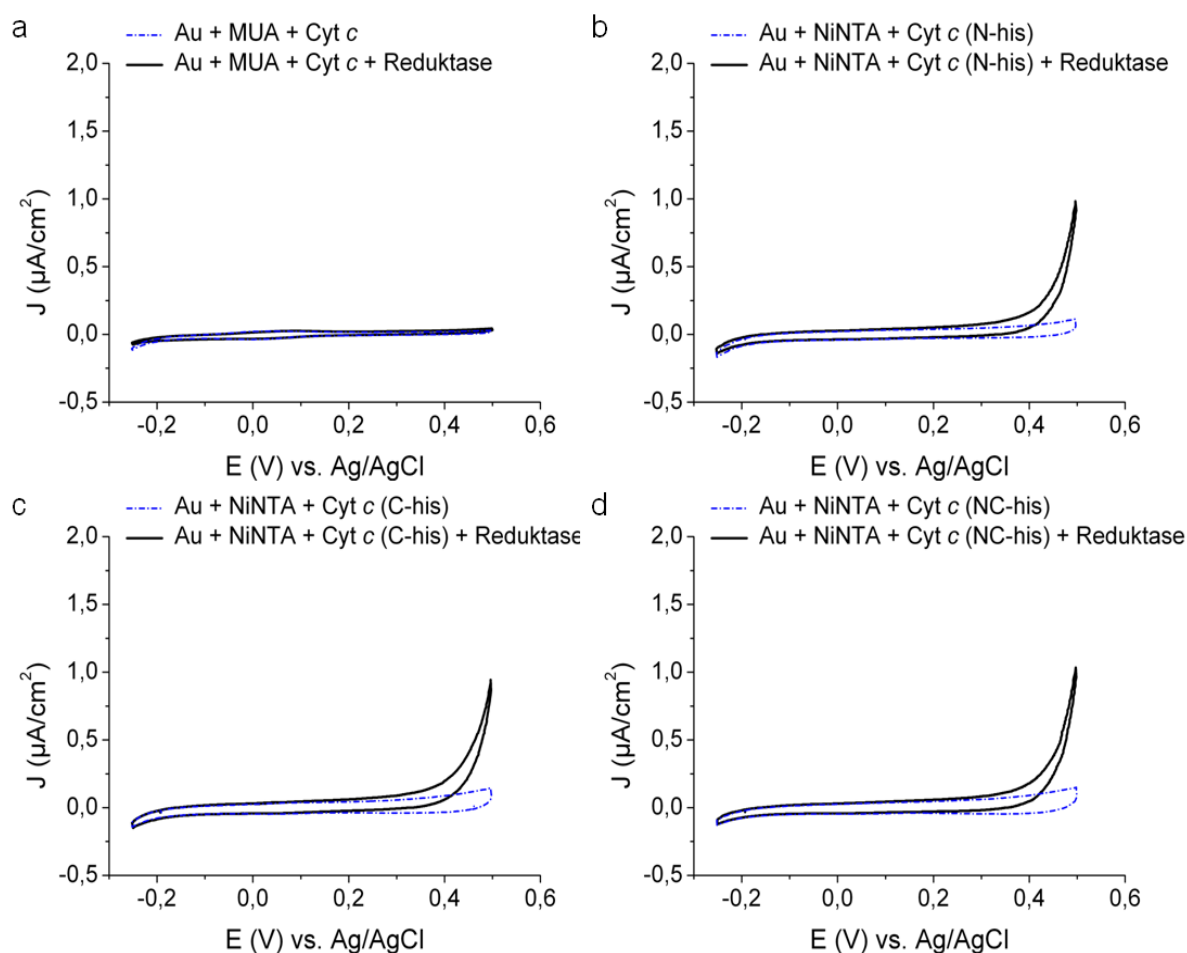


Abb. 5.48 Zyklovoltammogramme von Cyt c immobilisiert auf SAM beschichteten Au Elektroden in 5,78 mM Phosphatpuffer pH 7,0 (unterbrochene Linie) und in Phosphatpuffer mit Cyt c Reduktase und NADH (durchgehende Linie), bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 2 mV/s: (a) kommerzielles Cyt c elektrostatisch auf MUA immobilisiert; (b) Cyt c (N-his) über His Tag gebunden; (c) Cyt c (C-his) über His Tag gebunden; (d) Cyt c (NC-his) über His Tag gebunden.

Das Zyklovoltammogramm von Cyt c wurde wie zuvor beschrieben, allerdings mit einer geringeren Potentialvorschubgeschwindigkeit von 2 mV/s, aufgezeichnet (blaue unterbrochene Linie). Die langsame Vorschubgeschwindigkeit war nötig, da die enzymatische Reaktion mehrere Minuten in Anspruch nimmt (vergleiche Kapitel 4.5). Es ergab sich ein Formalpotential von etwa 10 mV, das gut mit den zuvor bei höheren

Vorschubgeschwindigkeiten ermittelten Werten für Cyt c übereinstimmt. Anschließend wurde, in leicht modifizierter Weise zu dem photochemischen Enzymtest, NADH Lösung in 5,78 mM Phosphatpuffer pH 7,0, sowie gelöste Cyt c Reduktase im gleichen Puffer zu der Elektrolytlösung pipettiert. Die sich so ergebenden Endkonzentrationen im Elektrolyten betrugen 5 mg/ml NADH und etwa 0,8 mg/ml Cyt c Reduktase. Alle Lösungen wurden unmittelbar vor Zugabe frisch hergestellt.

Direkt im Anschluss wurde das Zyklovoltammogramm erneut mit der gleichen Vorschubgeschwindigkeit aufgezeichnet. Hierbei zeigte sich keine signifikante Veränderung des Zyklovoltammogramms (Abbildung 5.48 a). Es kam somit, analog zu den Experimenten von [Haas *et al.* 2001] mit Cyt c Oxidase, zu keinem Elektronentransfer zwischen elektrostatisch immobilisiertem Cyt c und der in Lösung befindlichen Cyt c Reduktase. Die Reduktase bindet an derselben Stelle wie die Oxidase [Dickerson und Timkovich 1975], die jedoch aufgrund der elektrostatischen Anbindung zur Elektrodenseite wies und für beide Enzyme unzugänglich war. Ein vollkommen anderes elektrochemisches Verhalten zeigt sich bei Betrachtung der Graphen b-d in Abbildung 5.48. Hier sind die Zyklovoltammogramme der drei His getaggtten Cyt c Varianten gezeigt. Sie wurden über den His Tag an eine NiNTA funktionalisierte Au Elektrode immobilisiert und ebenfalls zunächst das Zyklovoltammogramm ohne Reduktase aufgezeichnet (blaue unterbrochene Linien). Das Formalpotential lag in allen Fällen zwischen 0 mV und 100 mV und deckt sich mit den Ergebnissen der früheren Untersuchungen (5.3.3). Nach Zugabe des Enzyms (durchgehende schwarze Linien), zeigte sich bei einem Potential über 70 mV ein zunächst langsamer, dann aber immer stärker werdender Anstieg des oxidativen Stromes, was typisch für elektroenzymatische Reaktionen ist [Willner und Katz 2005; Leger und Bertrand 2008]. Die dabei ablaufenden Reaktionen an der Elektrode sind in Abbildung 5.50 a/b schematisch veranschaulicht. Das über den Tag gebundene Cyt c (Abb. 5.50 a) wird zunächst elektrochemisch an der Elektrode oxidiert. Die Cyt c Reduktase ist daraufhin in der Lage, an das immobilisierte, oxidierte Cyt c zu binden und dieses enzymatisch zu reduzieren, wobei es Elektronen von NADH auf Cyt c überträgt (Abbildung 5.50 b). Dieses wird jedoch unmittelbar wieder elektrochemisch oxidiert. Dieser Prozess von elektrochemischer Oxidation und enzymatischer Reduktion wiederholt sich, bei entsprechend langsamem Potentialvorschub, bis zum Erreichen des Umkehrpotentials und führt zu der beobachteten starken Amplifikation des oxidativen elektrochemischen Signals. Der Anstieg des elektrokatalytischen Stromes ist generell von der Enzymkonzentration, sowie der Konzentration des Substrates in der Lösung, in diesem Falle von der NADH Konzentration,

abhängig [Diao *et al.* 2002]. Bei der Betrachtung von elektroenzymatischen Reaktionen an Elektrodenoberflächen beeinflusst zusätzlich die Konzentration der immobilisierten Spezies die Höhe des elektroenzymatischen Stromes. In allen drei Fällen wurden ähnliche oxidative Ströme in der Größenordnung von etwa $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ beobachtet, was darauf schließen lässt, dass bei gleichen Konzentrationen von Enzym und NADH, sowie einer vergleichbaren Elektrodenbedeckung mit Cyt c, die Reduktase an alle His getaggtten Cyt c Varianten in etwa gleich gut anbinden kann. Erfolgt der Potentialvorschub schneller, als die enzymatische Reaktion an der Elektrodenoberfläche abläuft, bzw. wird die maximale Effizienz des biokatalytischen Prozesses am Elektrodeninterface erreicht, so kommt es zu einem Sättigungseffekt und der anodische Strom steigt nicht weiter an [Willner *et al.* 1996]. Ein solcher Sättigungseffekt konnte hier nicht beobachtet werden.

Der gleiche Versuch wurde ebenfalls mit Cyt c (C-cys) wiederholt, wobei hier die Immobilisierung über den Cys Tag auf einer mit MPhOH beschichteten Au Elektrode erfolgte (Abbildung 5.49).

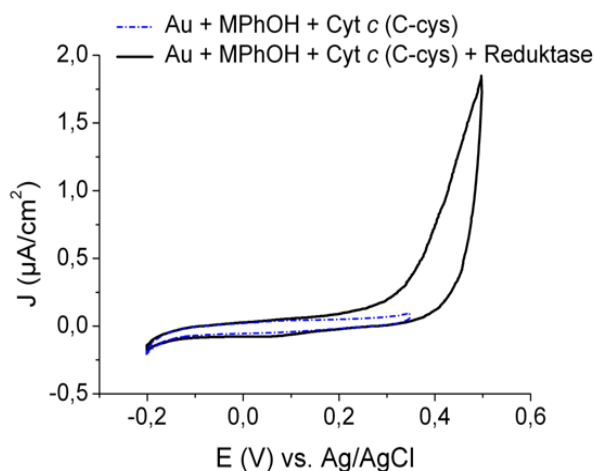


Abb. 5.49 Zyklovoltammogramm von Cyt c (C-cys) immobilisiert auf MPhOH beschichteter Au Elektrode in 5,78 mM Phosphatpuffer pH 7,0 (unterbrochene Linie) und in Phosphatpuffer mit Cyt c Reduktase und NADH (durchgehende Linie), bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 2 mV/s.

Es zeigte sich, dass auch Cyt c (C-cys) in gebundenem Zustand von der Reduktase in einer elektroenzymatischen Reaktion reduziert wurde und es in Folge dessen zu einem deutlich sichtbaren elektrokatalytischen, anodischen Strom kam. Bei gleichen Reaktionsbedingungen wurden mit $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ fast doppelt so hohe Ströme erreicht, wie bei den His getaggtten Cyt c Varianten. Eine Ursache hierfür kann der deutlich höhere Bedeckungsgrad mit redoxaktivem Cyt c (C-cys) sein (vergleiche Kapitel 5.3.3). Eine unterschiedliche Immobilisierung und

damit abweichende Orientierung von Cyt *c* auf der Elektrodenoberfläche, hat ebenfalls einen Einfluss auf die Reaktion. Der anodische Strom ist umso größer, je mehr Enzymmoleküle an die immobilisierten Cyt *c* Moleküle binden können. Cyt *c* ist ein recht kleines Protein im Vergleich zum Cyt *bc₁* Komplex, der etwa 225 kDa groß ist [Takayuki *et al.* 1983]. Hierdurch sind sterische Behinderungen bei der Anlagerung von Reduktase an das immobilisierte Cyt *c* zu vermuten. Je flexibler der Tag, über den Cyt *c* gebunden ist, umso einfacher kann die Reduktase binden. Hierdurch wird die Effizienz der enzymatischen Reaktion gesteigert, und es wird mehr Cyt *c* an der Elektrode elektrochemisch oxidiert. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass ein Elektronentransfer durch alle Tag gebundenen, rekombinanten Cyt *c* Varianten erfolgen kann. Elektronen wurden von der elektrostatisch an Cyt *c* gebundenen Reduktase auf Cyt *c* übertragen und von diesem, welches über den Affinitätstag an die Elektrode gebunden war, in einer elektrochemischen Reaktion auf die Elektrode übertragen (Abbildung 5.50 a/b).

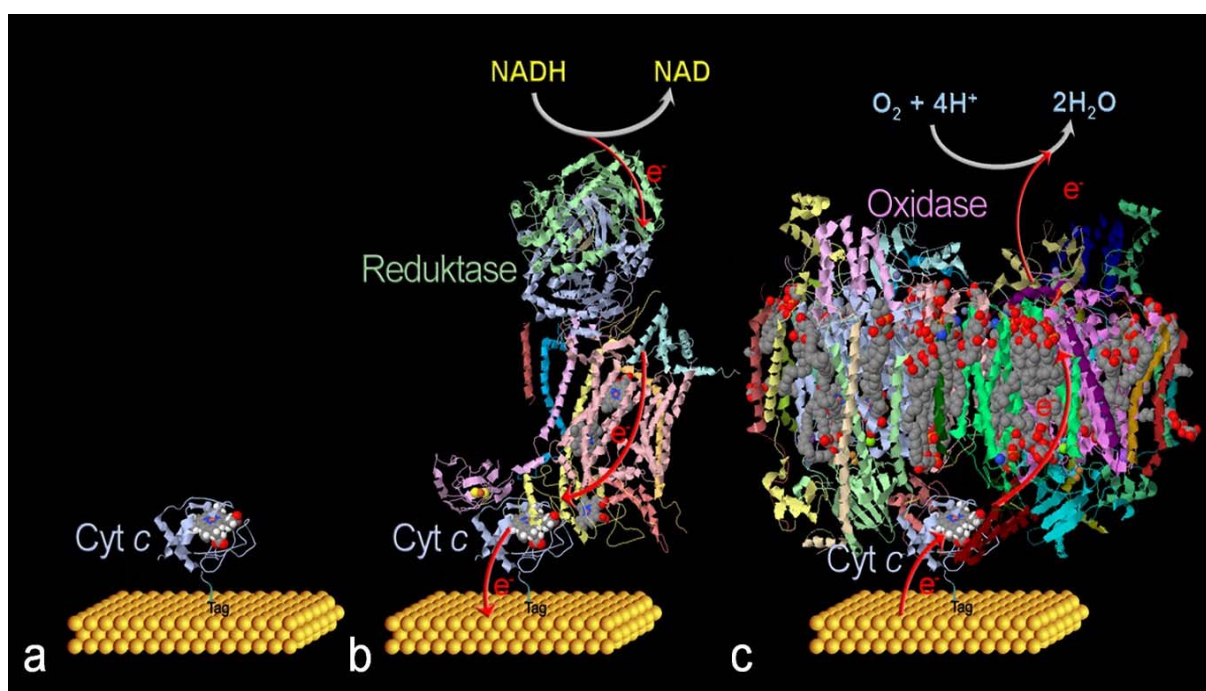


Abb. 5.50 Elektroenzymatische Reaktionen und damit verbundener Elektronentransfer von immobilisiertem Cyt *c*: (a) an der Au Elektrode über den Affinitätstag gebundenes Cyt *c*; (b) an immobilisiertes Cyt *c* gebundene Cyt *c* Reduktase (Struktur nach [Iwata *et al.* 1998]) und Elektronentransfer von NADH über Reduktase und Cyt *c* zur Elektrode; (c) an immobilisiertes Cyt *c* gebundene Cyt *c* Oxidase (Struktur nach [Muramoto *et al.* 2007]) und Elektronentransfer von der Elektrode, über Cyt *c* und Oxidase zum Sauerstoff. Die Abbildungen der einzelnen Proteine entstammen der RCSB Protein Datenbank und wurden mit dem Betrachtungstool *FirstGlance in Jmol* (Vers. 1.02) erstellt.

Nachdem erstmalig gezeigt werden konnte, dass die Reduktase in der Lage ist, Tag gebundenes Cyt c reversibel zu reduzieren, stellte sich die Frage, ob auch die Oxidase in der Lage sein würde, mit immobilisiertem Cyt c zu interagieren. In den Membranen der Mitochondrien katalysiert die Cyt c Oxidase die Sauerstoffreduktion, wobei H_2O entsteht. Die hierfür benötigten Elektronen werden von Cyt c bereitgestellt. Für die analoge elektroenzymatische Reaktion musste die Elektrolytlösung mit Sauerstoff gesättigt sein. Auf ein Spülen der Zelle mit Argon wurde daher verzichtet. Um die Reaktion zu erleichtern, ist zudem ein niedriger pH-Wert von Vorteil, sodass ein 5,78 mM Phosphatpuffer pH 6,0 zum Einsatz kam. Für die Untersuchungen wurde Rinder Cyt c Oxidase verwendet, die uns die Arbeitsgruppe von Professor Heberle zur Verfügung stellte. Sie wurde nach der Methode von [Yoshikawa *et al.* 1977] präpariert und in 5 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 mit 0,03% *n*-dodecyl- β -D-Maltosid als Detergenz solubilisiert. Analog zu den vorherigen Experimenten, wurde Cyt c (C-cys) über den Cys Tag an die mit MPhOH beschichtete Au Elektrode immobilisiert und zunächst das Zyklovoltammogramm bei 2 mV/s aufgezeichnet (Abbildung 5.51 blaue unterbrochene Linie).

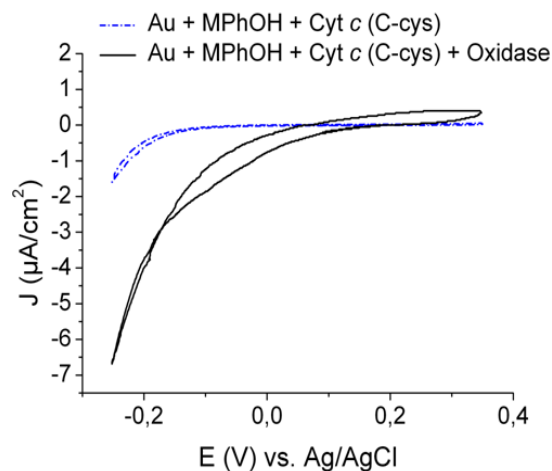


Abb. 5.51 Zyklovoltammogramme von Cyt c (C-cys) immobilisiert auf MPhOH beschichteter Au Elektrode in 5,78 mM Phosphatpuffer pH 6,0 (unterbrochene Linie) und in Phosphatpuffer mit Cyt c Oxidase (durchgehende Linie), bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 2 mV/s. Alle Messungen erfolgten unter Sauerstoffsättigung.

Aufgrund des hohen Sauerstoffanteils im Elektrolyten, kam es unterhalb eines Potentials von -150 mV zu einem deutlich negativen Strom, der auf die Sauerstoffreduktion an der Elektrodenoberfläche zurückzuführen ist. Anschließend erfolgte die Zugabe von hochkonzentrierter Cyt c Oxidase Lösung, sodass sich eine etwa 5 μM Enzymkonzentration

im Elektrolyten ergab. Nach erfolgter Enzymzugabe wurde das Zykelvoltammogramm erneut aufgezeichnet (Abb. 5.51 durchgehende Linie). Hierbei zeigte sich mit bis zu $-6,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ein mehr als vierfach höherer kathodischer Strom, als er zuvor beobachtet wurde. Dieser reduktive Strom kann nicht mehr durch die reine elektrochemische Sauerstoffreduktion an der Elektrodenoberfläche erklärt werden, sondern deutet auf eine elektroenzymatische Reaktion hin. Dabei ist interessant, dass der elektrokatalytische, kathodische Strompeak bei einem Potential zwischen 0 mV und 100 mV ansetzt. Hier liegt das Formalpotential von Cyt *c*. Daher kann geschlossen werden, dass es wie in Abbildung 5.50 c illustriert, zur elektrochemischen Reduktion von immobilisiertem Cyt *c* an der Elektrodenoberfläche kam, gefolgt von der enzymatischen Oxidation, wobei die Elektronen letztendlich auf Sauerstoff übertragen wurden. Sobald Cyt *c* enzymatisch oxidiert war, erfolgte erneut die elektrochemische Reduktion. Durch diesen, sich wiederholenden Zyklus aus elektrochemischer Reduktion und enzymatischer Oxidation, kam es zur Amplifikation des messbaren, kathodischen Stromes. Bei Potentialen unter -150 mV konnte eine Diffusionsüberspannung beobachtet werden, die auf eine Limitierung der O_2 Diffusion hindeutet. Mit diesem Versuch konnte, im Gegensatz zu den Untersuchungen von [Haas *et al.* 2001] mit elektrostatisch gebundenem Cyt *c*, demonstriert werden, dass bei einer Immobilisierung über einen Affinitätstag, ein erfolgreiches Anbinden der Oxidase möglich, und in Folge dessen ein elektroenzymatischer Strom messbar ist.

5.3.4 Immobilisierung von Cyt *c* zwischen Crossbarelektroden

Mit Hilfe der vorangegangenen Experimente konnte bestätigt werden, dass sich rekombinantes Cyt *c* mittels Immobilisierungstag und über elektrostatische Anbindung bifunktional immobilisieren lässt. Des Weiteren konnte der Elektronentransfer durch Cyt *c* mit Hilfe der Cyt *c* Reduktase bzw. Oxidase demonstriert werden. Um zu überprüfen, ob ein vergleichbarer Elektronentransfer auch stattfinden kann, wenn Cyt *c* (C-cys) bifunktional zwischen zwei Elektroden immobilisiert ist, wurden Experimente an Crossbarelektroden durchgeführt. Ziel war es Cyt *c*, wie in Abbildung 5.52 illustriert, zwischen einer Bottomelektrode (BE) und einer Topoelektrode (TE) zu immobilisieren und einen Tunnelstrom durch das Protein zu messen. Die Crossbarstrukturen wurden uns von Sony Deutschland (Stuttgart) zur Verfügung gestellt. Auf den verwendeten Chips befanden sich 16 parallele Leiterbahnen mit unterschiedlichen Durchmessern von $1 \mu\text{m}$ bis $10 \mu\text{m}$. Es sollten unterschiedliche Beschichtungen von BE und TE untersucht werden (Tabelle 5.11).

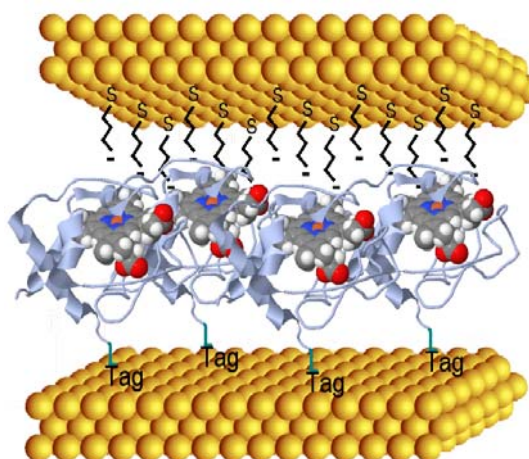


Abb. 5.52 Schematische Darstellung des zwischen zwei Crossbarelektroden bifunktional immobilisierten rekombinanten Cyt c.

Tab. 5.11 Übersicht der fünf Crossbar-Experimente mit unterschiedlicher Beschichtung von Bottomelektrode (BE) und Topelektrode (TE). Die Immobilisierung von Cyt c erfolgte immer auf der Bottomelektrode.

	1	2	3	4	5
TE	Au	Au	Au	Au	Au
SAM (TE)	MPA	MPhOH	-	MPA	-
Protein	Cyt c (C-cys)	Cyt c (C-cys)	Cyt c (C-cys)	-	-
SAM (BE)	MPhOH	MPA	MPA	MPhOH	-
BE	Au	Au	Au	Au	Au

Für die Adsorption der SAM Moleküle wurden die Bottomelektroden analog zur Beschichtung makroskopischer Elektroden in ethanolischer Lösung inkubiert. Die elektrostatische Immobilisierung von Cyt c sollte auf MPA erfolgen, da dieses Molekül aufgrund der kurzen Molekülkettenlänge einen effizienten Elektronentransfer verspricht. Die Immobilisierung über den Cys Tag sollte auf einer SAM aus MPhOH erfolgen. Die Inkubation der TE wurde in wässriger Lösung durchgeführt. Die Immobilisierung des Proteins erfolgte ausschließlich auf den BE. Nach der Beschichtung der Elektroden, wurden die TE mit Hilfe eines *Fineplacers* auf die BE gedruckt. Im Gegensatz zum standardisierten Druckverfahren unbeschichteter Au Elektroden, ergaben sich vereinzelt Probleme bei der Haftung der TE. In einigen Fällen (Versuch 1 und 2) konnte kein dauerhafter Kontakt zwischen BE und TE erzielt werden. Entsprechend ergab die elektrische Charakterisierung keine Ergebnisse. Im Gegensatz

hierzu war das Drucken bei den Versuchen 3 bis 5 erfolgreich, wobei nur bei Versuch 3 Cyt c zwischen BE und TE immobilisiert war. Versuch 4 diente dazu, den Elektronentransfer bzw. Tunnelstrom durch die SAM Schichten ohne dazwischen liegendes Cyt c zu messen. Versuch 5 hatte die Funktion eines Kontrollexperiments, um zu zeigen, dass Strom über den Kreuzungspunkt zweier unbeschichteter Au Elektroden fließen kann. Hierbei konnten wie exemplarisch in Abbildung 5.53 zu sehen ist, für alle Crossbars Kurzschlussströme gemessen werden.

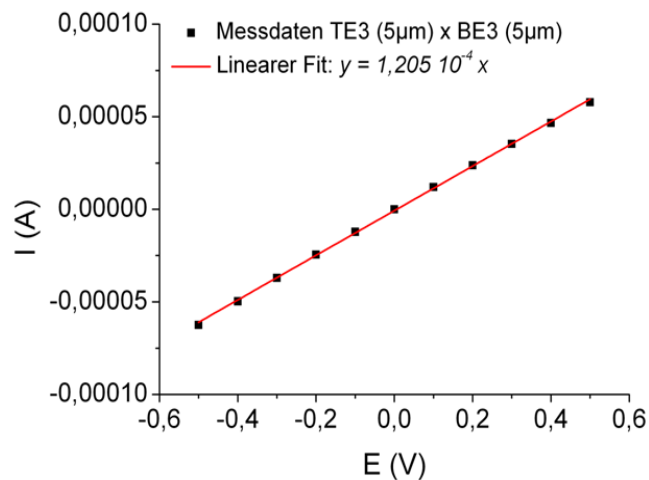


Abb. 5.53 Strom-Spannungs-Charakteristik für einen 0,5 V Zyklus von zwei direkt kontaktierten Crossbarelektroden. Angegeben ist der Strom gegenüber dem angelegten Potential. Die Messdaten wurden linear gefittet (rote Kurve). Es zeigt sich ein für Kurzschlussströme typisches ohmsches Verhalten mit $R = 12,05 \text{ k}\Omega$.

Bei Versuch 3 wurden drei unterschiedliche Stromantworten erhalten. Bei allen Kreuzungspunkten, bei denen beide Crossbars einen Durchmesser größer $5 \mu\text{m}$ hatten, wurden Kurzschlussströme gemessen. Im Gegensatz dazu, konnte bei keinem Kreuzungspunkt zweier Crossbars mit einem Durchmesser unter $2 \mu\text{m}$ ein Strom gemessen werden. Bei ca. 20% der Kreuzungspunkte ergaben sich, wie in Abbildung 5.54 gezeigt, Strom-Spannungskurven mit sigmoidalem Verlauf. Wie für Tunnelströme charakteristisch, ergab sich bei kleinen Potentialen eine lineare Stromantwort, wohingegen der Strom bei höheren Potentialen exponentiell anstieg.

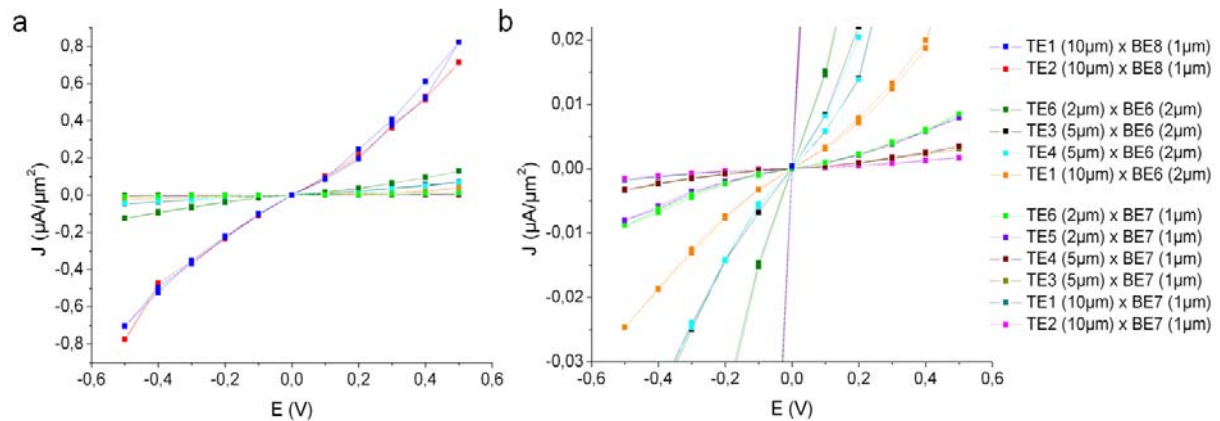


Abb. 5.54 Strom-Spannungs-Charakteristik für einen 0,5 V Zyklus von Cyt c immobilisiert zwischen zwei Crossbarelektroden in der Konfiguration (BE/MPA/Cyt c/TE). Angegeben ist die Stromdichte gegenüber dem angelegten Potential: (a) Strombereich zwischen $-0,9 \mu A/cm^2$ und $+0,9 \mu A/cm^2$; (b) Detailansicht des Strombereichs zwischen $-0,03 \mu A/cm^2$ und $+0,023 \mu A/cm^2$.

Bei Betrachtung der Tunnelkurven in Abbildung 5.54 a, zeigen sich bei zwei Kreuzungspunkten deutlich höhere Tunnelströme als bei den übrigen. Der bei einem Potential von 0,4 V pro Kontaktfläche gemessene Strom lag hier in einer Größenordnung von ca. $0,5 \mu A/\mu m^2$. Tunnelströme dieser Größenordnung sind charakteristisch für Tunnelprozesse durch die SAM, ohne dazwischen befindliches Protein. Vergleichbare Ströme von mindestens $0,8 \mu A/\mu m^2$ wurden von [Schwaab 2007] für Tunnelprozesse durch Buthanthiol zwischen Au Crossbarstrukturen beschrieben. Vergleichsmessungen mit Crossbarelektroden, die mit einer SAM aus MPA bzw. MPhOH beschichtet waren (Versuch 4), führten ausnahmslos zu Kurzschlusskontakten. Gerade bei kurzketigen Monolagen ist die Messung eines Tunnelstroms, aufgrund ihrer Neigung zu Oberflächendefekten, sehr schwierig [Schwaab 2007]. Hierdurch kommt es mit hoher Wahrscheinlichkeit in Defektbereichen zu Au-Au Kontakten und in Folge dessen können keine Tunnelströme gemessen werden. In Abbildung 5.54 a sind weitere Tunnelkurven mit deutlich geringeren Strömen aufgetragen. Diese Tunnelströme sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Tunnelprozesse durch Cyt c zurückzuführen. Abbildung 5.54 b zeigt diesen Strombereich in höherer Auflösung. Die Stromgrößen bei einem Potential von 0,4 V variierten zwischen 1 nA und 100 nA. Die Ströme waren deutlich niedriger, als man für Tunnelprozesse durch MPA erwarten würde und sprechen daher für einen Elektronentransfer durch die immobilisierte Proteinmonolage. Die Tunnelstromdichte bei nichtresonanten Tunnelereignissen lässt sich näherungsweise mit dem Modell von [Simmons 1963] berechnen.

$$J = \frac{e}{4\pi^2 \hbar d^2} \left\{ \left(\varphi_0 - \frac{eV}{2} \right) \exp \left[-\frac{2(2m_e)^{1/2}}{\hbar} \alpha \left(\varphi_0 - \frac{eV}{2} \right)^{1/2} d \right] - \left(\varphi_0 + \frac{eV}{2} \right) \exp \left[-\frac{2(2m_e)^{1/2}}{\hbar} \alpha \left(\varphi_0 + \frac{eV}{2} \right)^{1/2} d \right] \right\} \quad (5.8)$$

Dabei steht V für das Potential, d für den Abstand zwischen den beiden Elektroden, φ_0 beschreibt die mittlere Barrierehöhe und α ist ein materialspezifischer Parameter für die reduzierte Masse der Elektronen [Schwaab 2007]. Die Konstanten e , m_e und $\hbar$ stehen für Ladung und Masse eines Elektrons, sowie das „reduzierte Plancksche Wirkungsquantum“. Bei der Berechnung von Tunnelströmen muss zusätzlich der vom jeweiligen Tunnelprozess abhängige Stromabfall, in Abhängigkeit des Abstandes der Tunnelkontakte, berücksichtigt werden. Der materialabhängige Parameter β beschreibt diesen Stromabfall und berechnet sich bei kleinen Potentialen aus:

$$\beta = 2 \frac{\sqrt{2m_e}}{\hbar} \alpha \sqrt{\varphi_0} \quad (5.9)$$

In Abbildung 5.55 wurden die Daten einer Messung mit immobilisiertem Cyt c (C-cys) exemplarisch unter Verwendung der Simmonsgleichung (5.8) gefittet. Als Fitparameter wurden $\varphi_0 = 1,13$ eV und $\alpha = 0,492$ eingesetzt, wodurch sich $\beta = 0,54 \text{ \AA}^{-1}$ ergab. Für den Abstand der beiden Elektroden wurde ein Wert von 4 nm angenommen, der etwa der Summe aus Cyt c Durchmesser und SAM Schichtdicke entspricht. Vergleichbare Ergebnisse erzielte [Schwaab 2007] bei seinen Untersuchungen. Er immobilisierte kommerzielles Cyt c elektrostatisch zwischen einer mit MUA beschichteten BE und einer unbeschichteten TE und konnten Ströme von ca. 0,4 nA messen (bei einem Potential von 0,4 V), die er dem Tunnelprozess durch Cyt c zuschrieb. Bei einem Bedeckungsgrad von 80% entspricht das einem Tunnelstrom von etwa 4,5 fA pro Cyt c Molekül. Aus Abbildung 5.55 geht hervor, dass der hier gemessene Tunnelstrom mit 1,2 nA etwa dreimal so groß war. Andere Messkurven ergaben zum Teil noch deutlich höhere Tunnelströme. Bei einem angenommenen Bedeckungsgrad von ebenfalls 80% ergibt sich somit ein Tunnelstrom von mindestens 13,6 fA pro Cyt c Molekül. Die höheren Tunnelströme lassen sich primär auf die kurzketzige MPA Monolage zurückführen. [Schwaab 2007] immobilisierte Cyt c auf MUA, das etwa die vierfache Länge von MPA hat und somit zu einem deutlich größeren Abstand zwischen den Elektroden führte.

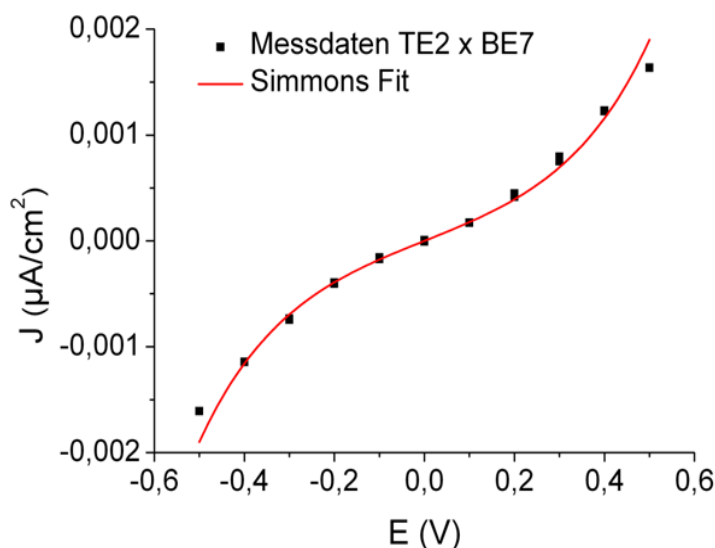


Abb. 5.55 Strom-Spannungs-Charakteristik für einen 0,5 V Zyklus von Cyt c immobilisiert zwischen zwei Crossbarelektroden in der Konfiguration (BE/MPA/Cyt c/TE). Angegeben ist die Stromdichte gegenüber dem angelegten Potential. Die rote Kurve markiert den Fit nach [Simmons 1963].

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit rekombinantes Cyt c verwendet, welches über den Cys Tag in der Lage sein sollte, funktional an die Au TE zu binden. Ein höherer Tunnelstrom, aufgrund der besseren Anbindung an die TE, kann somit ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Interessant bleibt die starke Streuung der Tunnelkurven. Hierfür kommen unterschiedliche Erklärungen in Frage. In allen Fällen wurde aus den gemessenen Strömen die Stromdichte, bezogen auf die Fläche der sich kreuzenden Leiterbahnen berechnet. Dabei unberücksichtigt bleibt, dass mitunter nicht alle Bereiche dieser Fläche tatsächlich einen Beitrag zum Tunnelstrom leisten. Ursache hierfür können z.B. eine ungleichmäßige Bedeckung mit Protein, teilweise denaturiertes Cyt c oder fehlendes Häm sein.

Mit den explorativen Crossbar-Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich Cyt c zwischen zwei Elektroden immobilisieren lässt und ein Tunnelstrom zwischen BE und TE messbar ist. Dieser Tunnelstrom kann aufgrund seiner Größenordnung einem Tunnelprozess durch das immobilisierte Protein zugeschrieben werden. Ein Tunnelstrom zwischen BE und TE ohne Protein, führt hingegen zu deutlich höheren Stromwerten. Es bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen, die genauen Abläufe und Zusammenhänge, insbesondere die Einflüsse der Immobilisierungsart beim Tunnelprozess, an Crossbarelektroden aufzuklären.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, durch Kombination unterschiedlicher Immobilisierungstechniken eine Strategie zur funktionalen Immobilisierung von Cytochrom c (Cyt c) auf zwei-terminalen nanoskopischen Elektroden Bauelementen zu entwickeln. Die Immobilisierung von Redoxproteinen auf nanoskopischen Elektroden ist für die molekulare Bioelektronik von besonderem Interesse, um die für den Ladungstransfer verantwortlichen Prozesse an Einzelmolekülen aufklären zu können und so ein tieferes Verständnis der molekularen Mechanismen beim Elektronentransfer durch Biomoleküle zu bekommen. Redoxproteine sind aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften vielversprechende Kandidaten für neuartige bioelektronische Bauelemente. Cyt c ist ein sehr gut charakterisiertes und stabiles Redoxprotein, das aufgrund seines Modellcharakters in Bezug auf Elektronentransferreaktionen in dieser Arbeit als Untersuchungsobjekt gewählt wurde. Für Cyt c werden unterschiedlichste Immobilisierungsstrategien für die Beschichtung von Elektrodenoberflächen beschrieben. Untersuchungen an makroskopischen 2D Elektroden sollten zeigen, welche der konventionellen Strategien sich besonders gut für die Immobilisierung von Cyt c eignen. Das Linkermolekül, über das die Immobilisierung des Proteins erfolgen sollte, musste dabei zwei wesentliche Funktionen erfüllen. So war erforderlich, dass das Linkermolekül, neben einer funktionalen Anbindung des Proteins an die Oberfläche, ohne es dabei zu denaturieren, auch zu einer guten elektronischen Verknüpfung mit dem Protein führte. Langkettige Moleküle, wie etwa Polymere oder Proteinkomplexe schieden somit als Linkermoleküle aus. Um eine gerichtete bifunktionale Immobilisierung einzelner Cyt c Moleküle zwischen zwei nanoskopischen Elektroden (z.B. Crossbarelektroden oder Nanoelektroden in einem Bruchkontakt) zu ermöglichen, sollte eine zweite komplementäre Immobilisierungsstrategie zum Einsatz kommen. Im Gegensatz zur unspezifisch gerichteten Bindung bei physikalischen und größtenteils auch chemischen Immobilisierungsstrategien, erfolgt die Immobilisierung von Proteinen über Affinitätstags spezifisch und sehr effizient. Über die Beschaffenheit und Position des Tags, lässt sich die Orientierung der Proteine an der Oberfläche beeinflussen. Mit Hilfe rekombinanter DNA-Techniken, sollten His₆ Tags und alternativ ein speziell entwickelter Cystein Tag an N- bzw. C-terminaler Position von Pferde Cyt c angehängt werden. Die Funktionalität der exprimierten rekombinanten Proteine sollte überprüft, das bifunktionale Immobilisierungsverhalten auf Goldoberflächen untersucht und die Redoxaktivität in Abhängigkeit der

Immobilisierung auf makroskopischen 2D Elektroden charakterisiert werden. Dabei sollte im Hinblick auf die geplante Verwendung des rekombinanten Proteins gezeigt werden, dass ein reversibler Elektronentransfer zwischen Elektrode und bifunktional immobilisiertem Cyt *c*, bei gleichzeitigem Erhalt der natürlichen Funktionalität, erfolgen kann. Die wichtigsten Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen werden im Folgenden kurz zusammengefasst.

Cyt *c* ließ sich aufgrund seiner positiven Nettoladung, als Folge multipler Lysingruppen an der Proteinoberfläche, elektrostatisch auf carboxylierte, makroskopische 2D Au(111) Elektroden immobilisieren. Als SAM wurden aliphatische Thioalkansäuren unterschiedlicher Kettenlänge, sowie unterschiedliche Konformationsisomere von Mercaptobenzoessäure (MBA) verwendet. Das Redoxverhalten von Cyt *c* in Abhängigkeit der verwendeten SAM wurde mittels Zykovoltammetrie bestimmt. Bei allen untersuchten aliphatischen Thioalkansäuren, sowie 3-MBA und 4-MBA, konnte ein reversibler Ladungstransfer zwischen Elektrode und Cyt *c* beobachtet werden. Die Formalpotentiale entsprachen überwiegend den aus der Literatur bekannten Werten. Aus den Flächenladungsdichten wurden Bedeckungsgrade zwischen 50% und 70% ermittelt. Es zeigte sich, dass MPA für die Immobilisierung von Cyt *c* weniger geeignet ist, da es einen potentialabhängigen pK_a -Wert besitzt, und sich als Folge bei den elektrochemischen Messungen kein klar abgegrenzter Redoxpeak ergab. In Abhängigkeit der Potentialvorschubgeschwindigkeit ergab sich, in Übereinstimmung mit der Literatur, bei allen Thioalkansäuren eine Separation der Redoxpeaks. Der kinetische Effekt war mit zunehmender Kettenlänge der SAM Moleküle stärker ausgeprägt. Diese Abhängigkeit zeigte sich ebenfalls bei der Standardgeschwindigkeitskonstante, die mit zunehmender Kettenlänge geringere Werte annahm. Dabei limitiert die zunehmende Distanz zwischen Elektrode und Cyt *c* den Tunnelprozess durch die SAM. Bei sehr kurzkettingen SAMs war der für den effizienten Elektronentransfer bei elektrostatisch gebundenem Cyt *c* beschriebene Gating-Prozess geschwindigkeitslimitierend, bei dem es zu einer Reorientierung des Proteins an der Elektrodenoberfläche während des Ladungstransfers kommt. Bei Molekülkettenlängen unter 10 Kohlenstoffatomen ließ sich die Standardgeschwindigkeitskonstante nicht weiter steigern. Auch für untersuchte π -konjugierten SAMs zeigte sich ein ähnliches Verhalten wie bei kurzkettingen aliphatischen Thioalkansäuren. Trotz ihrer guten Elektronentransfereigenschaften kam es auch hier aufgrund des Gating-Prozesses zu keiner Steigerung der Standardgeschwindigkeitskonstante. Die Redoxantworten waren, genauso wie die aus den Flächenladungsdichten errechneten Bedeckungsgrade, geringer als bei aliphatischen

Thioalkansäuren. 2-MBA eignet sich aufgrund der ortho-Stellung der Carboxylgruppe nicht für die Immobilisierung von Cyt c. Die besten Ergebnisse, in Bezug auf eine hohe Oberflächenbedeckung und einen reversiblen, kinetisch weniger stark limitierten Redoxprozess, wurden bei den kurzkettigen Thioalkansäuren mit MUA erzielt.

Untersuchungen an homogenen gemischten Monolagen aus MUA und SPT12 zeigten, dass sich die Immobilisierungseffizienz von Cyt c und die daraus resultierende Bedeckung durch Wahl eines geeigneten Mischungsverhältnisses steigern lässt. Die bei einem äquimolaren Mischungsverhältnis beider Moleküle erzielte maximale Bedeckung führte aber zu einer Verringerung der Redoxaktivität. Ursächlich hierfür war der Abstand zwischen Elektrode und Protein. Während auf MUA immobilisiertes Cyt c einen Abstand zur Elektrode besitzt, der eine effektive elektrische Kopplung für den Elektronentransfer ermöglicht, ist dieser bei SPT12 zu groß. Mit zunehmendem SPT12 Anteil in der SAM, konnten somit weniger Cyt c Moleküle einen Beitrag zum Elektronentransfer leisten, sodass als Folge die Redoxaktivität abnahm.

Als Alternative zur elektrostatischen Immobilisierung wurde Cyt c kovalent auf Au(111) Elektroden aufgebracht. Die direkte kovalente Immobilisierung über die Thiolgruppen von Cys14 und Cys17 führte zu keinem definierten Redoxsignal. Da die internen Cysteine kovalent an die Häm-Gruppe gebunden sind, ist zu vermuten, dass es bei der Immobilisierung an die Goldoberfläche zu einer Umstrukturierung oder sogar Freisetzung der Häm-Gruppe kommt. Dieses kann zum vollständigen Verlust der Redoxaktivität von Cyt c führen. Erfolgreicher verlief die kovalente Immobilisierung von Cyt c über freie Aminogruppen. Hierzu wurde die Elektrode mit reaktiven SAMs beschichtet, die spezifisch an Aminogruppen koppeln. Ein Problem bei dieser Immobilisierungsstrategie ist die nicht definierte Orientierung des Proteins, wodurch sich das beobachtete, deutlich schlechtere Redoxverhalten im Vergleich zu elektrostatisch immobilisiertem Cyt c erklären lässt. Die anhand der Flächenladungsdichten ermittelten Bedeckungsgrade von knapp über 10%, deuten ebenfalls auf eine sehr inhomogene und größtenteils für einen Elektronentransfer unvorteilhafte Orientierung von Cyt c hin. Auch bei kovalent gebundenem Protein zeigte sich mit zunehmender Potentialvorschubgeschwindigkeit eine Peakseparation, die jedoch deutlich stärker war, als bei elektrostatisch immobilisiertem Cyt c auf SAMs mit identischer Kettenlänge. Entsprechend niedriger lagen auch die Standardgeschwindigkeitskonstanten, was für eine deutlich größere Distanz zwischen Elektrode und Redoxzentrum spricht. Während bei der elektrostatischen Immobilisierung die Häm-Gruppe aufgrund der positiven Nettoladung des Proteins in definierter Orientierung sehr nahe an der Elektrodenoberfläche

liegt, kommt es bei der kovalenten Immobilisierung aufgrund der fehlenden Dipolwirkung zu deutlich mehr Rotationsfreiheit und damit zu größeren Abständen zwischen der Elektrodenoberfläche und der Häm-Gruppe. Das gegenüber elektrostatisch gebundenem Cyt c leicht verschobene Formalpotential, erklärt sich mit der unterschiedlichen Koordinierung der Häm-Gruppe. Bei der elektrostatischen Bindung von Cyt c kommt es zu einer zweiten nicht-nativen Strukturform. Die veränderte Koordinierung führt zu einem niedrigeren Formalpotential. Bei kovalent immobilisiertem Cyt c dominiert diese Form offenbar nicht, sodass das Redoxpotential weniger stark herabgesetzt wird. Im Gegensatz zur elektrostatischen Immobilisierung, insbesondere auf MUA, ist die kovalente Immobilisierung unter den hier beschriebenen Bedingungen aufgrund der schlechteren Redoxaktivität und der fehlenden Spezifität weniger geeignet.

Untersuchungen mit immobilisierter Microperoxidase-11 bestätigten, dass die Redoxkinetik nicht allein von der Molekülkettenlänge der SAM bestimmt wird, sondern stark von der Orientierung und dem dadurch bedingten intramolekularen Elektronentransfer beeinflusst wird. Die Häm-Gruppe von Microperoxidase-11 wird nur von wenigen Aminosäuren umgeben und kann direkt über hydrophobe Wechselwirkungen an die SAM Oberfläche binden. Damit ergibt sich eine minimale Distanz zwischen Redoxzentrum und Elektrodenoberfläche, die zu einer deutlich schnelleren Kinetik führt, im Vergleich zu elektrostatisch auf Molekülen gleicher Kettenlänge immobilisiertem Cyt c.

Nanostrukturierte Oberflächen sind für bioelektronische Anwendungen von besonderem Interesse. Da die in der molekularen Bioelektronik angestrebten nanoskopischen Bauelemente nanostrukturierte Oberflächen besitzen, wurde der Einfluss der Nanostrukturierung auf die Redoxaktivität, die elektronische Kopplung zwischen Protein und Elektrode, sowie die Kinetik des Ladungstransfers untersucht. Es wurden verschiedene Methoden zur Oberflächencharakterisierung verwendet. Hierbei stellte sich heraus, dass diffusionskontrollierte Systeme für die Bestimmung der redoxaktiven Oberfläche ungeeignet sind. Die besten Ergebnisse ließen sich mit oberflächengebundenen Redoxsystemen erzielen, bei denen Diffusion keinen Einfluss hat. Durch elektrostatische Immobilisierung von Cyt c auf Au Nanopillar Strukturen konnte gezeigt werden, dass sich bei niedrigen Vorschubgeschwindigkeiten eine vergleichbare Oberflächenvergrößerung ergibt, wie mit Hilfe anderer oberflächengebundener Systeme. Eine Begünstigung des Ladungstransfers aufgrund der Oberflächenstrukturierung, wie zuvor in der Literatur berichtet, konnte nicht bestätigt werden. Es zeigte sich aber ein deutlicher kinetischer Effekt, der mit steigender Potentialvorschubgeschwindigkeit zu hohen Peakseparationen und niedrigeren

Ladungsdichten führte. Derartige Effekte können auch für nanoskalige Bauelemente nicht ausgeschlossen werden. Trotz dieses Effektes kann immobilisiertes Cyt c bei niedrigen Vorschubgeschwindigkeiten auch zur quantitativen Bestimmung der Oberflächenvergrößerung nanostrukturierter Elektroden genutzt werden.

Um ortsspezifische Bindungstags an das Protein anzuknüpfen, wurde das für Pferde Cyt c kodierende Wildtypgen erfolgreich modifiziert. Mit Hilfe rekombinanter DNA Technologie, konnten die Sequenzen für N- und C-terminale Affinitätstags eingefügt werden. Insgesamt wurden fünf unterschiedliche Konstrukte in einen für die Expression von Pferde Cyt c in *E. coli* optimierten Expressionsvektor kloniert. Wildtyp Cyt c (Wt), Cyt c (N-His) mit N-terminalem His Tag, Cyt c (C-his) mit C-terminalem His Tag und Cyt c (NC-his) mit je einem His Tag am N- und C-Terminus ließen sich erfolgreich exprimieren. Ebenfalls exprimiert werden konnte Cyt c (C-cys) mit C-terminalem Cystein Tag. Dieser Tag wurde speziell für die Immobilisierung auf mit Thioalkoholen beschichteten Au Elektroden entwickelt. Nur das Konstrukt Cyt c (N-his/C-cys) ließ sich nicht exprimieren. Die Aufreinigung der rekombinanten Cyt c Varianten mittels Ionenaustauschchromatographie führte zu guten Ausbeuten im Bereich von 20 mg/L. Bei Affinitätschromatographischer Aufreinigung wurden sogar Ausbeuten bis 60 mg/L erreicht. Durch eine Ammoniumsulfatfällung konnte Cyt c weiter angereichert werden. Gleichzeitig kam es aber zur teilweisen Co-Präzipitation von Cyt c, wodurch die Gesamtausbeute deutlich reduziert wurde. Die UV/VIS spektroskopischen Untersuchungen haben gezeigt, dass trotz des prokaryotischen Expressionssystems maximal 40-60% des rekombinanten Cyt c mit einer Häm-Gruppe beladen waren. Mit Hilfe des photochemischen Enzymtests konnte nachgewiesen werden, dass die Häm-beladenen, rekombinanten Cyt c Varianten funktional sind und von Cyt c Reduktase reduziert werden.

Mit Hilfe von Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie und AFM Versuchen konnte bestätigt werden, dass sich alle rekombinanten Cyt c Varianten sowohl elektrostatisch auf MUA, als auch über ihren spezifischen Affinitätstag auf entsprechend funktionalisierten Au Oberflächen immobilisieren lassen. Die elektrostatische Immobilisierung von His getaggen Cyt c Varianten führte zu höheren Oberflächenbedeckungen im Vergleich zum Wildtyp, was mit einer geänderten Orientierung an der Oberfläche bzw. der Ausbildung einer Doppel- oder Multilage erklärt werden kann. Eine signifikante Desorption von der Oberfläche konnten nur bei Cyt c (C-cys) beobachtet werden. Ursache hierfür waren offenbar Wechselwirkungen zwischen immobilisierten und in Lösung befindlichen Proteinen. Die Immobilisierung von Cyt c über His bzw. Cys Tag führte ebenfalls zu hohen Bedeckungen. Durch anschließende

Zugabe von Au Nanopartikeln wurde gezeigt, dass sich die rekombinanten Cyt c Varianten bifunktional immobilisieren lassen und simultan elektrostatisch und über ihren Affinitätstag Bindungen eingehen.

Das Redoxverhalten aller rekombinanten Cyt c Varianten wurde elektrochemisch mittels Zyklovoltammetrie charakterisiert. Hierzu wurde Cyt c zunächst elektrostatisch auf MUA beschichteten Au(111) Elektroden immobilisiert. Während sich bei rekombinatem Wildtyp und Cyt c (C-cys) ein deutlicher und mit kommerziellem Cyt c vergleichbarer reversibler Ladungstransfer zeigte, ließ sich für keines der His getaggtten Konstrukte ein Redoxsignal detektieren. Erst durch Verwendung einer kurzketigen SAM aus MPA, konnte eine schwache Redoxaktivität beobachtet werden. Dieses Verhalten deutet auf eine deutlich größere Distanz zwischen Redoxzentrum und Elektrode hin. Durch den His Tag werden zusätzliche positive Ladungen auf der Proteinoberfläche platziert, wodurch sich die Oberflächenladung von Cyt c verändert, und eine weniger gerichtete Orientierung bei der elektrostatischen Bindung die Folge ist. Da der Cys Tag keinen Beitrag zur Nettoladung leistet, tritt dieser Effekt bei Cyt c (C-cys) nicht auf. Entsprechend ergeben sich annähernd identische elektrochemische Ergebnisse, wie für Wt Cyt c. Auch die Immobilisierung über den jeweiligen Affinitätstag führte zu unterschiedlichen elektrochemischen Ergebnissen. In allen Fällen konnte ein reversibler Ladungstransfer beobachtet werden. Die Stärke des Redoxsignals und das Formalpotential schwankten jedoch. Bei allen Tag gebundenen Cyt c Varianten war das Redoxpotential deutlich positiver, als bei elektrostatisch auf MUA immobilisiertem Wt Cyt c. Als naheliegende Ursache kann der gleiche Effekt vermutet werden, der auch bei kovalenter Immobilisierung zu einer Verschiebung des Formalpotentials führt. Während bei elektrostatisch immobilisiertem Cyt c das Formalpotential durch die Bildung der nicht-nativen Strukturform herabgesenkt wird, scheint bei Tag immobilisiertem Cyt c die Häm-Gruppe überwiegend in nativer Konformation gebunden zu sein, wodurch sich ein positiveres Formalpotential ergibt. Die Redoxaktivität der His getaggtten Proteine war gering. Die aus den Flächenladungsdichten errechneten Bedeckungsgrade lagen nur für Cyt c (C-his) über 10%. Da die SPR Messungen ähnlich hohe Oberflächenbedeckungen ergaben wie für elektrostatisch gebundenes Cyt c, deutet das auf eine für den Elektronentransfer unvorteilhafte Orientierung hin, sodass nur ein geringer Teil der immobilisierten Moleküle einen Beitrag zum Ladungstransfer leistet. Wie bei der kovalenten Immobilisierung, fehlt auch hier die Ausrichtung des Proteins durch dessen elektrostatische Wechselwirkung mit der Oberfläche. Cyt c ist nur punktuell über das Tag-Molekül an die Oberfläche gebunden, was zu deutlich höheren Bewegungsfreiheitsgraden

für das Protein führt. Die bessere Redoxaktivität von Cyt c (C-his) kann damit erklärt werden, dass in unmittelbarer Nähe zum C-Terminus einer der postulierten Elektronentransferpfade verläuft. Ein deutlich effektiverer Ladungstransfer wurde bei Cyt c (C-cys) beobachtet. Bei der Immobilisierung auf einer mit MPhOH beschichteten Au(111) Elektrode war das Redoxsignal von allen Tag Mutanten am stärksten ausgeprägt. Hier ergab sich aus den Flächenladungsdichten der Redoxpeaks ein Bedeckungsgrad von 75%, was auf eine für den Ladungstransfer günstige Oberflächenorientierung hindeutet. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei kürzeren SAM Molekülen (MEOH und MPOH) ein schwächeres Redoxsignal, dafür aber eine schnellere Kinetik. Aufgrund der kurzen Kettenlänge verfügt das Tag immobilisierte Protein über mehr Rotationsfreiheitsgrade, was offenbar zu einer weniger definierten Orientierung und damit einem schlechteren Ladungstransfer führt. Eine SAM längerer Moleküle schränkt die freie Beweglichkeit des Tag gebundenen Proteins ein und führt so zu einer definierteren Orientierung. Eine Verschiebung des Redoxpotentials konnte, in Übereinstimmung mit der Literatur, immer dann beobachtet werden, wenn an der Bindung des Proteins an die Elektrodenoberfläche keine elektrostatischen oder hydrophoben Wechselwirkungen beteiligt waren, die verstärkt zu einer andersartigen Koordinierung der Häm-Gruppe führen.

Mit Hilfe einer elektroenzymatischen Reaktion konnte gezeigt werden, dass die natürlichen Reaktionspartner von Cyt c, die Enzyme Cyt c Oxidase und Cyt c Reduktase in der Lage sind, elektrostatisch an Tag gebundenes Cyt c zu binden und dieses zu reduzieren bzw. zu oxidieren. Die elektroenzymatische Reduktion von Tag gebundenem Cyt c wurde für alle rekombinanten Cyt c Varianten gezeigt. Im Gegensatz dazu, ließ sich elektrostatisch gebundenes Wt Cyt c nicht durch Cyt c Reduktase reduzieren, da die Bindedomäne der Elektrode zugewandt war. Für Cyt c (C-cys) wurde zusätzlich die Interaktion mit Cyt c Oxidase nachgewiesen. In beiden Fällen kam es zu einem reversiblen Elektronentransfer durch Cyt c, welches über den Tag an die Elektrode und elektrostatisch an das jeweilige Enzym gebunden war. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass ein Elektronentransfer über bifunktional gebundenes Cyt c prinzipiell möglich ist, und bei der Immobilisierung mittels Affinitätstag die Bindedomäne für Cyt c Oxidase bzw. Reduktase zugänglich bleibt, sodass Cyt c seine natürliche Funktionalität behält.

In einem ersten Experiment wurde Cyt c (C-cys) zwischen zwei Crossbarelektroden immobilisiert. Hierbei erfolgte die Bindung auf der BE elektrostatisch und die TE wurde so aufgebracht, dass sich der Cys Tag an das Gold anlagern konnte. Es wurden Ströme detektiert, die aufgrund ihrer Charakteristik und Größe einem Tunnelprozess durch Cyt c

Moleküle zugeordnet werden konnten. Es wurde somit gezeigt, dass ein Elektronentransfer durch bifunktional zwischen zwei Elektroden immobilisiertes Cyt c möglich ist. Es bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen, die genauen Abläufe und Zusammenhänge, insbesondere die Einflüsse der Immobilisierungsart beim Tunnelprozess an Crossbarelektroden aufzuklären.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, mehrere funktionale rekombinante Cyt c Varianten herzustellen, die alle für weiterführende elektrochemische Anwendungen, insbesondere auf nanoskopischen Elektroden geeignet sind. Besonders vielversprechend ist Cyt c (C-cys), aufgrund seiner sehr guten Redoxeigenschaften. Mit allen rekombinanten Cyt c Varianten ist eine bifunktionale Immobilisierung zwischen zwei-terminalen Nanoelektroden möglich. Gleichzeitig lässt sich die Redoxaktivität potentialabhängig steuern. Es bleibt Gegenstand weiterer Forschung, das rekombinante Cyt c zwischen unterschiedlichen Nanoelektroden, wie etwa nanoskopischen Crossbarelektroden, oder in *Nanogaps* zu immobilisieren und den Ladungstransfer einzelner Moleküle zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang sind auch Untersuchungen mit dem Rastertunnelmikroskop (STM) vielversprechend, bei denen die Proteine bifunktional zwischen Substrat und STM Spitze immobilisiert und Tunnelströme gemessen werden können. Die im Rahmen dieser Arbeit bereitgestellten rekombinanten Proteine bilden somit einen Grundstock für eine Vielzahl weiterführender und vielversprechender Untersuchungen an Nanoelektroden und sollen zur Charakterisierung des Ladungstransfers in asymmetrischen Metall/Protein/Metall Kontakten Verwendung finden. Hierdurch können sie einen maßgeblichen Beitrag zur Aufklärung der Elektronentransferprozesse einzelner Redoxproteine leisten.

7. Literaturverzeichnis

[Adamson 1990]

Adamson A.W. (1990) *Physical Chemistry of Surfaces, 5th Ed.* John Wiley & Sons, New York.

[Adman und Harrison 1985] Adman E.T., in: Harrison P.M. (Ed.), (1985) *Topics in Molecular and Structural Biology: Metalloproteins*. Chemie Verlag, Weinheim.

[Albrecht et al. 2005]

Albrecht T., Li W., Ulstrup J., Haehnel W., Hildebrandt P. (2005) *Chem. Phys. Chem.* 6, 961.

[Allen et al. 1984]

Allen P.M., Hill H.A.O., Walton N.J. (1984) *J. Electroanal. Chem.* 178, 69.

[Anandan et al. 2006]

Anandan V., Rao Y.L., Zhang G. (2006) *Int. J. Med. I*, 73.

[Armstrong und Wilson 2000]

Armstrong F.A., Wilson G.S. (2000) *Electrochimica Acta* 45, 2623.

[Ataka und Heberle 2003]

Ataka K., Heberle J. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* 125, 4986.

[Ataka et al. 2004A]

Ataka K., Heberle J. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* 126, 9445.

[Ataka et al. 2004B]

Ataka K., Giess F., Knoll W., Naumann R., Haber-Pohlmeier S., Richter B. and Heberle J. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* 126, 16199.

[Avila et al. 2000]

Avila A., Gregory B. W., Niki K., Cotton T. M. (2000) *J. Phys. Chem. B*, 104, 2759.

[Balland et al. 2008]

Balland V., Hureau C., Cusano A.M., Liu Y., Tron T., Limoges B. (2008) *Chemistry – A European Journal* 14 (24), 7186.

[Banci *et al.* 1999]

Banci L., Bertini I., Huber J.G., Spyroulias G.A., Turano P. (1999) *J. Biol. Inorg. Chem.* 4, 21.

[Bardea *et al.* 1997]

Bardea A., Katz E., Bückmann A.F., Willner I. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* 119, 9114.

[Barth *et al.* 1990]

Barth J.V., Brune H., Ertl G., Behm R.J. (1990) *Physical Reviews B*, 42, 9307.

[Bertini *et al.* 2006]

Bertini I., Cavallaro G., Rosato A. (2006) *Chemical Reviews* 106, 90.

[Bestemann *et al.* 2003]

Bestemann K., Lee J., Wiertz F.G.M., Heering H.A. (2003) *Nano Letters* 3, 727.

[Betancor *et al.* 2006]

Betancor L., Lopez-Gallego F., Hidalgo A., Alonso-Morales N., Mateo C., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M. (2006) *Enzyme Microb. Technol.* 39, 877.

[Binnig *et al.* 1986]

Binnig G., Quate F.C., Gerber C. (1986) *Physical Reviews Lett.* 56, 930.

[Birnboim und Doly 1979]

Birnboim H.C., Doly J. (1979) *Nucl. Acids Res.* 7, 1513.

[Bradford 1976]

Bradford M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248.

[Bockris *et al.* 2000]

Bockris J.O.M., Reddy A.K.N. Gamboa-Aldeco M. (2000) *Modern Electrochemistry 2A - Fundamentals of Electrode Processes, 2nd Edition*. Kluwer Academic / Plenum Publ., New York

[Bortolotti *et al.* 2006]

Bortolotti C.A., Battistuzzi G., Borsari M., Facci P., Ranieri A., Sola M. (2006) *J. Am. Chem. Soc.* 128, 5444.

[Bücker 2007]

Bücker P. (2007) *Dissertation: Integration von Rezeptoren in inerte Matrices zur markierungsfreien und quantitativen Detektion biospezifischer Wechselwirkungen mit LSPR-aktiven Nanopartikeloberflächen*. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

[Bullock *et al.* 1987]

Bullock W.O., Fernandex, J.M. and Short, J.M. (1987) *BioTechniques* 5, 376.

[Bushnell *et al.* 1990]

Bushnell G.W., Louie G.V., Brayer G.D. (1990) *J. Mol. Biol.* 214, 585.

[Butt und Keilin 1962]

Butt W.D., Keilin D. (1962) *Proc. R. Soc. London B*512, 429.

[Chen R.J. *et al.* 2001]

Chen R. J., Zhang Y., Wang D., Dai H. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* 123, 3838.

[Chen X. *et al.* 2001]

Chen X., Xie H., Kong J., Deng J. (2001) *Biosens. Bioelectron.* 16, 115.

[Chen *et al.* 2006]

Chen F., Li X., Hihath J., Huang Z., Tao N. (2006) *J. Am. Chem. Soc.* 128, 15874.

[Chen *et al.* 2007]

Chen E., Abel C.J., Goldbeck R.A., Kliger D.S. (2007) *Biochemistry* 46, 12463.

[Chi *et al.* 2001]

Chi Q., Zhang J., Anderson J.E.T., Ulstrup J. (2001) *J. Phys. Chem. B.* 105, 4669.

[Chi *et al.* 2005]

Chi Q., Farver O., Ulstrup J. (2005) *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (45), 16203.

[Choi *et al.* 2008]

Choi S.H., Kim B.S., Frisbie C.D. (2008) *Science* 320, 1482.

[Creager *et al.* 1992]

Creager S., Hockett L.A., Rowe G.K. (1992) *Langmuir* 8, 854.

[Cui *et al.* 2001]

Cui X.D., Primak A., Zarate X., Tomfohr J., Sankey O.F., Moore A., Gust D., Harris G., Lindsay S.M. (2001) *Science* 294, 571.

[Davis *et al.* 1998]

Davis W.B., Svec W.A., Ratner M.A., Wasielewski M.R. (1998) *Nature* 396, 60.

[Davis *et al.* 2005]

Davis J.J., Morgan D.A., Wrathmell C.L., Axford D.N., Zhao J., Wang N. (2005) *Journal of Materials Chemistry* 15, 2160.

[Davis *et al.* 2008]

Davis J.J., Peters B., Xi W. (2008) *J. Phys.: Condens. Matter* 20, 374123.

[Delfino *et al.* 2007]

Delfino I., Bonanni B., Badacchini C., Bizzarri A.R., Cannistraro S. (2007) *J. Phys.: Condens. Matter* 19, 225009.

[De Wael *et al.* 2008]

De Wael K., Buschop H., De Smet L., Adriaens A. (2008) *Talanta* 76, 309.

[Diao *et al.* 2002]

Diao P., Liu Z., Wu B., Nan X., Zhang J., Wie Z. (2002) *Chem. Phys. Chem.* 3, 898.

[Dickerson *et al.* 1967]

Dickerson R.E., Kopka M.L., Borders C.L., Varnum J., Weinzierl J.E. (1967) *J. Mol. Biol.* 29, 77.

[Dickerson und Timkovich 1975]

Dickerson R. E., Timkovich R. (1975) *Enzymes*, 3rd Ed. 11, 397.

[Dickertmann *et al.* 1974]

Dickertmann D., Schultze J.W., Vetter K.J. (1974) *Electroanal. Chem. Interf. Electrochem.* 55, 429.

[Döpner *et al.* 1999]

Döpner S., Hildebrandt P., Rosell F.I., Mauk A.G., von Walter M., Buse G., Soulimane T. (1999) *Eur. J. Biochem.* 261, 379.

[Dong *et al.* 2004]

Dong X., Stothard P., Forsythe I.J., Wishart D.S. (2004) *Nucleic Acids Res.* 32 (Web Server issue): W660-4.

[Dumont *et al.* 1987]

Dumont M.E., Ernst J.F., Hampsey D.M., Sherman F. (1987) *EMBO J.* 6, 235.

[Fedurco 2000]

Fedurco M. (2000) *Coordination Chemistry Reviews* 209, 263.

[Feng *et al.* 1997]

Feng Z.Q., Imabayashi S., Kakiuchi T., Niki K. (1997) *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 93, 1367.

[Fernandez-Lafuente *et al.* 1993]

Fernandez-Lafuente R., Rosell C.M., Rodriguez V., Santana C., Soler G., Bastida A., Guisan G.M. (1993) *Enzyme Microb. Technol.* 15, 546.

[Forrer *et al.* 2000]

Forrer P., Schlottig F., Siegenthaler H., Textor M. (2000) *J. Appl. Electrochem.* 30, 533.

[Gershon und Khilko 1995]

Gershon P.D., Khilko S. (1995) *Journal of Immunological Methods* 183, 65-76

[Gerunda *et al.* 2004]

Gerunda M., Bortolotti C.A., Alessandrini A., Sola M., Battistuzzi G., Facci P. (2004) *Langmuir* 20, 8812.

[Glick und Pasternak 2003]

Glick B.R., Pasternak J.J. (2003) *Molecular Biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA*. ASM Press, Washington DC.

[Göpel 1995]

Göpel W. (1995) *Biosens. Bioelectron.* 10, 35.

[Guisseppi-Elie *et al.* 2002]

Guisseppi-Elie A., Lei C.H., Baughman R.H. (2002) *Nanotechnology* 13, 559.

[Haas *et al.* 2001]

Haas A.S., Pilloud D.L., Reddy K.S., Babcock G.T., Moser C.C., Blasie J.K., Dutton P.L. (2001) *J. Phys. Chem. B* 105, 11351.

[Hansen *et al.* 2003]

Hansen A.G., Boisen A., Nielsen J.U., Wackerbarth H., Chorkendorff I., Andersen J.E.T., Zhang J., Ulstrup J. (2003) *Langmuir* 19, 3419.

[Heath *et al.* 1998]

Heath J.R., Kuekes P.J., Sniders G.S., Williams R.S. (1998) *Science* 280, 1716.

[Heering *et al.* 2004]

Heering H.A., Wiertz F.G.M., Dekker C., de Vries S. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* 126, 11103.

[Heery *et al.* 1990]

Heery D.M., Gannon F., Powell R. (1990) *Trends Genet.* 6, 173.

[Hermanson 1996]

Hermanson G.T. (1996) *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, Elsevier.

[Hobara *et al.* 1998]

Hobara D., Ota M., Imabayashi S., Niki K., Kakiuchi T. (1998) *J. Electroanal. Chem.* 444, 113.

[Hobara *et al.* 1999]

Hobara D., Sasaki T., Imabayashi S., Kakiuchi T. (1999) *Langmuir* 15, 5073.

[Hochuli *et al.* 1987]

Hochuli E., Döbeli H., Schacher A. (1987) *J. Chromatogr.* 411, 177.

[Hu *et al.* 2005]

Hu Y., Das A., Hecht M.H., Scoles G. (2005) *Langmuir* 21, 9103.

[Hu *et al.* 2006]

Hu C.C., Chang K.H., Lin M.C., Wu Y.T. (2006) *Nano Letters* 6, 2690.

[Hunte *et al.* 2002]

Hunte C., Solmaz S., Lange C. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* 1555, 21.

[Ichihara *et al.* 2006]

Ichihara T., Akada J.K., Kamei S., Ohshiro S., Sato D., Fujimoto M., Kuramitsu Y., Nakamura K. (2006) *J. Proteome Res.* 5, 2144.

[Imabayashi *et al.* 1997]

Imabayashi S., Iida M., Hobara D., Feng Z.Q., Niki K., Kakiuchi T. (1997) *J. Electroanal. Chem.* 428, 33.

[Imabayashi *et al.* 2001]

Imabayashi S., Hobara D., Kakiuchi T. (2001) *Langmuir* 17, 2560.

[Imabayashi *et al.* 2005]

Imabayashi S., Mita T., Kakiuchi T. (2005) *Langmuir* 21, 2474.

[Iwata *et al.* 1998]

Iwata S., Lee J.W., Okada K., Lee J.K., Iwata M., Rasmussen B., Link T.A., Ramaswamy S., Jap B.K. (1998) *Science* 281, 64.

[Jeuken 2003]

Jeuken L.J.C. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* 1604, 67.

[Ji *et al.* 2006]

Ji X., Jin B., Jin J., Nakamura T. (2006) *J. Electroanal. Chem.* 590, 173.

[Jiang *et al.* 1995]

Jiang L., McNeil C.J., Cooper J.M. (1995) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 12, 1293.

[Jiang *et al.* 1997]

Jiang L., Glidle A., Mc Neil C.J., Cooper J.M. (1997) *Biosens. Bioelectron.* 12, 1143.

[Jiang *et al.* 2004]

Jiang K., Schadler L.S., Siegel R.W., Zhang X., Zhang H. (2004) *J. Mater. Chem.* 14, 37.

[Joachim *et al.* 2000]

Joachim C., Gimzewski J.K., Aviram A. (2000) *Nature* 408, 541.

[Johnson und Martin 2005]

Johnson D.L., Martin L.L. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* 127, 2018.

[Johnsson *et al.* 1991]

Johnsson B., Lofas S., Lindquist G. (1991) *Anal. Biochem.* 198, 268.

[Katz *et al.* 2003]

Katz E., Shipway A.N., Willner I. (2003) *Handbook of Fuelcells - Fundamentals, Technology, Applications. Vol. 1, Part 4.* John Wiley, Chichester.

[Katz *et al.* 2004A]

Katz E., Willner I., Wang J. (2004) *Electroanalysis* 16, 19.

[Katz *et al.* 2004B]

Katz E., Sheeney-Haj-Ichia L., Willner I. (2004) *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, 3292.

[Kim *et al.* 2006]

Kim J.-K., Koo J.P., Huh C.-J., Ha J.S., Pi U.H., Choi S.-Y., Kim J.H. (2006) *Applied Surface Science* 252, 4951.

[Kitagawa *et al.* 2005]

Kitagawa K., Morita T., Kimura S. (2005) *J. Phys. Chem. B* 109, 13906.

[Kolb 1996]

Kolb D.M. (1996) *Prog. Surf. Sci.* 51, 109.

[Koppenol und Margoliash 1982]

Koppenol W.H., Margoliash E.J. (1982) *Biol. Chem.* 257, 4426.

[Krahne *et al.* 2002]

Krahne R., Yacoby A., Shtrikman H., Bar-Joseph I., Dadosh T., Sperling J. (2002) *Appl. Phys. Lett.* 81, 730.

[Kretschmann und Raether 1968]

Kretschmann E., Raether E. (1968) *Z. Phys.* 216, 2135.

[Krings *et al.* 2003]

Krings N., Strehblow H.-H., Kohnert J., Martin H.-D. (2003) *Electrochimica Acta* 49, 167.

[Kushmerick *et al.* 2003]

Kushmerick J.G., Naciri J., Yang J.C., Shashidar R. (2003) *Nano Letters* 3, 897.

[Lämmli 1970]

Lämmli U.K. (1970) *Nature* 227, 680.

[Langen *et al.* 1995]

Langen R., Chang I., Germanas J.P., Richards J.H., Winkler J.R., Gray H.B. (1995) *Science* 268, 1733.

[Laviron 1979]

Laviron E. (1979) *J. Electroanal. Chem.* 101, 19.

[Lee *et al.* 2007]

Lee J.M., Park H.K., Jung Y., Kim J.K., Jung S.O., Chung B.H. (2007) *Analytical Chemistry* 79, 2680.

[Leger und Bertrand 2008]

Leger C., Bertrand P. (2008) *Chemical Reviews* 108, 2379.

[Leopold *et al.* 2002A]

Leopold M.C., Black J.A., Bowden E.F. (2002) *Langmuir* 18, 978.

[Leopold *et al.* 2002B]

Leopold M.C., Bowden E.F. (2002) *Langmuir* 18, 2239.

[Lötzbeyer *et al.* 1994]

Lötzbeyer T., Schuhmann W., Katz E., Falter J., Schmidt H.-L. (1994) *J. Electroanal. Chem.* 377, 291.

[Louie und Brayer 1990]

Louie G.V., Brayer G.D. (1990) *J. Mol. Biol.* 214, 527.

[Lu *et al.* 1996]

Lu B., Smyth M.R., O'Kennedy R. (1996) *Analyst* 121, 29R.

[Luo und Walt 1989]

Luo S., Walt D.R. (1989) *Analytical Chemistry* 61, 1079.

[Lvov *et al.* 1998]

Lvov Y.M., Lu Z.Q., Schenkman J.B., Zu X.L. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* 120, 4073.

[Mahler 1955]

Mahler H.R. (1955) *Methods in Enzymology* 2, 688.

[Margoliash und Schejter 1966]

Margoliash E., Schejter A. (1966) *Advan. Protein Chem.* 21, 113.

[Margoliash und Walasek 1967]

Margoliash E., Walasek O.F. (1967) *Methods in Enzymology* 10, 339.

[Maruccio *et al.* 2007]

Maruccio G., Marzo P., Krahne R., Passaseo A., Cingolani R., Rinaldi R. (2007) *Small* 3, 1184.

[McKnight *et al.* 2003]

McKnight T.E., Melechko A.V., Guillorn M.A., Merkulov V.I., Doktycz M.J., Culbertson C.T., Jacobson S.C., Lowndes D.H., Simpson M.L. (2003) *J. Phys. Chem. B* 107, 10722.

[McKnight *et al.* 2006]

McKnight T.E., Melechko A.V., Fletcher B.L., Jones S.W., Hensley D.K., Peckys D.B., Griffin G.D., Simpson M.L., Ericso M.N. (2006) *J. Phys. Chem. B* 110, 15317.

[Metzger *et al.* 1997]

Metzger R.M., Chen B., Hopfner U., Lakshmikantham M.V., Vuillaume D., Kawai T., Wu X., Tachibana H., Hughes T.V., Sakurai H., Baldwin J.W., Hosch C., Cava M.P., Brehmer L., Ashwell G.J. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* 119, 10455.

[Meyer und Lamberts 1965]

Meyer T.S., Lamberts B.L. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 107, 144.

[Monien *et al.* 2007]

Monien B.H., Drepper F., Sommerhalter M., Lubitz W., Haehnel W. (2007) *J. Mol. Biol.* 371, 739.

[Morris *et al.* 1987]

Morris R.B., Franta D.J., White H.S. (1987) *J. Phys. Chem.* 91, 3559.

[Mowatt und Clayton 1988]

Mowatt M.R., Clayton C.E. (1988) *Mol. Cell Biol.* 8, 4055.

[Mullis *et al.* 1986]

Mullis K.B., Farona F.A., Schar S., Saiki R.G.H., Ehrlich H. (1986) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51, 263.

[Muramoto *et al.* 2007]

Muramoto K., Hirata K., Shinzawa-Itoh K., Yoko-O S., Yamashita E., Aoyama H., Tsukihara T., Yoshikawa S. (2007) *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 7881.

[Murgida und Hildebrandt 2001]

Murgida D.H., Hildebrandt P. (2001) *J. Phys. Chem. B.* 105, 1578.

[Murgida und Hildebrandt 2008]

Murgida D.H., Hildebrandt P. (2008) *Chem. Soc. Rev.* 37, 937.

[Musameh *et al.* 2002]

Musameh M., Wang J., Merkoci A., Lin L.H. (2002) *Electrochem. Commun.* 4, 743.

[Nakano *et al.* 2007]

Nakano K., Yoshitake T., Yamashita Y., Bowden E.F. (2007) *Langmuir* 23, 6270.

[Nastri *et al.* 1998]

Nastri F., Lombardi A., Morelli G., Pedone C., Pavone V., Chottard G., Battioni P., Mansuy D. (1998) *J. Biol. Inorg. Chem.* 3, 671.

[Nguyen-Vu *et al.* 2006]

Nguyen-Vu T.D.B., Chen H., Cassell A.M., Andrews R., Meyyappan M., Li J. (2006) *Small* 2, 89.

[Nieba *et al.* 1997]

Nieba L., Nieba-Axmann S. E., Personn A., Hamalainen M., Edebratt F., Hansson A., Lidholm J., Magnusson K., Karlsson A.F., Pluckthun A. (1997) *Anal. Biochem.* 252, 217.

[Nieto *et al.* 2003]

Nieto F.J.R., Andreasen G., Martins M.E., Castez F., Salvarezza R.C., Arvia A.J. (2003) *J. Phys. Chem. B* 107, 11452.

[Niki *et al.* 2002]

Niki K., Sprinkle J.R., Margoliash E. (2002) *Bioelectrochemistry* 55, 37.

[Niki *et al.* 2003]

Niki K., Hardy W.R., Hill M.G., Li H., Sprinkle J.R., Margoliash E., Fujita K., Tanimura R., Nakamura N., Ohno H., Richards J.H., Gray H.B. (2003) *J. Phys. Chem. B* 107, 9947.

[Nuzzo *et al.* 1990]

Nuzzo R.G., Dubois L.H., Allara D.L. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* 112, 558.

[Oesch und Janata 1983]

Oesch U., Janata J. (1983) *Electrochimica Acta* 28, 1237.

[Otto 1968]

Otto A. (1968) *Z. Phys.* 216, 398.

[Paborsky *et al.* 1995]

Paborsky L.R., Dunn K.E., Gibbs C.S., Dougherty J.P. (1995) *Anal. Biochem.* 234, 60.

[Pale-Grosdemange *et al.* 1991]

Pale-Grosdemange C., Simon E.S., Prime K.L., Whitesides G.M. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113, 12.

[Pappas *et al.* 2007]

Pappas T.C., Wickramanyake W.M.S., Jan E., Motamedi M., Brodwick M., Kotov N.A. (2007) *Nano Letters* 7, 513.

[Patel *et al.* 1997]

Patel N., Davies M.C., Hartshorne M., Heaton R.H., Roberts C.J., Tendler S.J.B., Williams P.M. (1997) *Langmuir* 13, 6485.

[Patolsky *et al.* 2004]

Patolsky F., Zheng G., Hayden O., Lakadamyali M., Zhuang X., Lieber C.M. (2004) *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (39), 14017.

[Patolsky *et al.* 2006]

Patolsky F., Zheng G., Lieber C.M. (2006) *Analytical Chemistry* 78, 4261.

[Petrovic *et al.* 2005]

Petrovic J., Clark R.A., Yue H., Waldeck D.H., Bowden E.F. (2005) *Langmuir* 21, 6308.

[Plieth 1982]

Plieth W.J. (1982) *J. Phys. Chem.* 86, 3166.

[Pollock *et al.* 1998]

Pollock W.B., Rosell F.I., Twitchett M.B., Dumont M.E., Mauk A.G. (1998) *Biochemistry* 37, 6124.

[Porath *et al.* 1975]

Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G. (1975) *Nature* 18, 598.

[Protsailo und Fawcett 2000]

Protsailo L.V., Fawcett W.R. (2000) *Electrochimica Acta* 45, 3497.

[Raitman *et al.* 2002]

Raitman O.A., Katz E., Bückmann A.F., Willner I. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124, 6487.

[Ramachandran *et al.* 1998]

Ramachandran S., Thompson R.W., Gam A.A., Neva F.A. (1998) *J. Infect. Dis.* 177, 196.

[Reed *et al.* 1997]

Reed M.A., Zhou C., Muller C.J., Burgin T.P., Tour J.M. (1997) *Science* 278, 252.

[Reed *et al.* 2001]

Reed M.A., Chen J., Rawlett A.M., Price D.W., Tour J.M. (2001) *Appl. Phys. Lett.* 78, 3735.

[Rieder und Bosshard 1980]

Rieder R., Bosshard H.R. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4732.

[Rinaldi und Cingolani 2004]

Rinaldi R., Cingolani R. (2004) *Physica E.* 21, 45.

[Rivas *et al.* 2002]

Rivas L., Murgida D.H., Hildebrandt P. (2002) *J. Phys. Chem. B.* 106, 4823.

[Roberts und Pique 1999]

Roberts V.A., Pique M.E. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 38051.

[Roth und Joachim 1997]

Roth S., Joachim C. (1997) *Atomic and Molecular Wires*. Kluwer, Dordrecht.

[Roy und Gupta 2006]

Roy I., Gupta M.N. (2006) *Methods in Biotechnology - Immobilization of Enzymes and Cells*. 2nd Edition. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

[Rumbley *et al.* 2002]

Rumbley J.N., Hoang L., Englander S.W., (2002) *Biochemistry* 41, 13894.

[Rusmini *et al.* 2007]

Rusmini F., Zhong Z., Feijen J. (2007) *Biomacromolecules* 8, 1775.

[Ruzgas *et al.* 1996]

Ruzgas T., Csoregi E., Emneus J., Gorton L., Marko-Varga G. (1996) *Anal. Chim. Acta* 330, 123.

[Ruzgas *et al.* 1999]

Ruzgas T., Gaigalas A., Gorton L. (1999) *J. Electroanal. Chem.* 469, 123.

[Sagara *et al.* 2006]

Sagara T., Kubo Y., Hiraishi K. (2006) *J. Phys. Chem. B* 110, 16550.

[Salomon 2005]

Salomon O. (2005) *Dissertation: Charakterisierung des Ladungstransfers von immobilisiertem Cytochrom c*. RWTH-Aachen.

[Sambrook *et al.* 1989]

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, NY.

[Sander und Tan 2003]

Sander M.S., Tan L.S. (2003) *Adv. Funct. Mater.* 13, 393

[Santoni *et al.* 2004]

Santoni E., Scatraglia S., Sinibaldib F., Fioruccib L., Santuccib R., Smulevich G. (2004) *Journal of Inorganic Biochemistry* 98, 1067.

[Scheller 1977]

Scheller F. (1977) Functional properties of adsorbed hemoproteins. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 4, 490.

[Schmickler 1996]

Schmickler W. (1996) *Grundlagen der Elektrochemie*. Springer-Verlag, Heidelberg.

[Schmid *et al.* 1997]

Schmid E.L., Keller T.A., Dienes T.Z., Vogel H. (1997) *Analytical Chemistry* 69, 1979.

[Schmidt und Skerra 2007]

Schmidt T.G.M., Skerra A. (2007) *Nature Protocols* 2, 1528.

[Schröper *et al.* 2008]

Schröper F., Brüggemann D., Mourzina Y., Wolfrum B., Offenhäusser A., Mayer D. (2008) *Electrochimica Acta* 53, 6265.

[Schwaab 2007]

Schwaab D. (2007) *Dissertation: Surface Patterning by means of Soft Lithography for Molecular and Bio-Electronics*. RWTH-Aachen.

[Segal *et al.* 2000]

Segal D., Nitzan A., Ratner M., Davis W.B. (2000) *J. Phys. Chem. B* 104, 2790.

[Sherman *et al.* 1968]

Sherman F., Stewart J.W., Parker J.H., Inhaber E., Shipman N.A., Putterman G.J., Gardinsky R.L., Margoliash E. (1968) *J. Biol. Chem.* 242, 5446.

[Shi *et al.* 2004]

Shi J, Zhang X., Xie W., Zhou Y., Zhang Z., Deng J., Cass A.E.G., Zhang Z., Pang D., Zhang C. (2004) *Analytical Chemistry* 76 (3) 632.

[Shimizu *et al.* 2006]

Shimizu K.T., Fabbri J.D., Jelincic J.J., Melosh N.A. (2006) *Advanced Materials* 18, 1499.

[Sigma 2002]

Sigma Quality Control Test Procedure (2002) *Enzymatic Assay of Cytochrome c Reductase*, (EC 1.6.99.3): <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/enzyme%20assay/c3381enz.pdf>

[Simmons 1963]

Simmons J.G. (1963) *J. Appl. Phys.* 34, 1793.

[Smith *et al.* 1976]

Smith L., Davies H.C., Nava M.E. (1976) *Biochemistry* 15, 5827.

[Smith *et al.* 1977]

Smith H.T., Staudenmayer N., Millett F. (1977) *Biochemistry* 16, 4971.

[Smith *et al.* 2006]

Smith C.L., Milea G.S., Nguyen G.H. (2006) *Top. Curr. Chem.* 261, 63.

[Song *et al.* 1993]

Song S., Clark R.A., Bowden E.F., Tarlov M.J. (1993) *J. Phys. Chem.* 97, 6564.

[Srivatsa *et al.* 1998]

Srivatsa V., Rao I., Anderson K.W., Bachas L.G. (1998) *Microchim. Acta* 128, 127.

[Stade und Brambl 1980]

Stade S., Brambl R. (1980) *Experimental Mycology* 4, 186.

[Stayton *et al.* 1992]

Stayton P.S., Olinger J.M., Jiang M., Bohn P.W., Sligar S.G. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114, 9298.

[Takayanagi 1982]

Takayanagi K. (1982) *Ultramicroscopy* 8, 145.

[Takayuki *et al.* 1983]

Takayuki O., Masashi T., Yoshiharu S. (1983) *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80 (4), 921.

[Tao *et al.* 2000]

Tao N.J., Li C.Z., He H.X. (2000) *J. Electroanal. Chem.* 492, 81.

[Tarlov und Bowden 1991]

Tarlov M.J., Bowden E.F. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113, 1847.

[Terpe 2003]

Terpe K. (2003) *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 523.

[Timkovich 1975]

Timkovich R. (1975) *Thesis*, California Institute of Technology.

[Vela *et al.* 1990]

Vela M.E., Salvarezza R.C., Arvia A.J. (1990) *Electrochimica Acta* 35, 117.

[Viitala *et al.* 2000]

Viitala T., Vikholm I., Peltonen J. (2000) *Langmuir* 16, 4953.

[Wang *et al.* 2003]

Wang W., Lee T., Reed M.A. (2003) *Physical Reviews B* 68, 035416.

[Wang *et al.* 2005]

Wang W., Lee T., Reed M.A. (2005) *Rep. Prog. Phys.* 68, 523.

[Wei *et al.* 2004]

Wei J.J., Liu H., Niki K., Margoliash E., Waldeck D.H. (2004) *J. Phys. Chem. B* 108, 16912.

[Will *et al.* 1983]

Will O.H., Ruddat M., Garber E.D. (1983) *Current Microbiology* 8, 23.

[Willner *et al.* 1996]

Willner I., Heleg-Shabtai V., Blonder R., Katz E., Tao G., Bückmann A.F., Heller A. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118, 10321.

[Willner *et al.* 1999]

Willner I., Heleg-Shabtai V., Katz E., Rau H.K., Haehnel W. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121, 6455.

[Willner und Katz 2005]

Willner I., Katz E. (2005) *Bioelectronics*. Wiley-VCH, Weinheim.

[Winkler und Gray 1992]

Winkler J.R., Gray H.B. (1992) *Chemical Reviews* 92, 369.

[Winogradov *et al.* 1972]

Winogradov S.N., Bitar K.G., Andjusk K.W. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 267, 273.

[Wold *et al.* 2002]

Wold D.J., Haag R., Rampi M.A., Frisbie C.D. (2002) *J. Phys. Chem. B* 106, 2813.

[Wolfrum *et al.* 2006A]

Wolfrum B., Mourzina Y., Sommerhage F., Offenhäusser A. (2006) *Nano Letters* 6, 453.

[Wolfrum *et al.* 2006B]

Wolfrum B., Mourzina Y., Mayer D., Schwaab D., Offenhäusser A. (2006) *Small* 2, 1256.

[Wu und Hu 2004]

Wu Y., Hu S. (2004) *Anal. Chim. Acta* 527, 37.

[Wu und Hu 2007]

Wu Y., Hu, S. (2007) *Microchim. Acta* 159, 1.

[Wuttke *et al.* 1992]

Wuttke D.S., Bjerrum M.J., Winkler J.R., Gray H.B. (1992) *Science* 256, 1007.

[Xu *et al.* 1993]

Xu J., Li H.-L., Zhang Y. (1993) *J. Phys. Chem.* 97, 11497.

[Xu und Tao 2003]

Xu B.Q., Tao N.J. (2003) *Science* 301, 1221.

[Xu *et al.* 2004]

Xu J., Wang G., Zhang Q., Zhou D., Chen H. (2004) *Electrochem. Commun.* 6, 278.

[Yoo und Park 2007]

Yoo S.H., Park S. (2007) *Adv. Mater.* 19, 1612.

[Yoshikawa *et al.* 1977]

Yoshikawa S., Choc M.G., O'Toole M.C., Caughey W.S. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 5498.

[Yu *et al.* 2003]

Yu X., Chattopadhyay D., Galeska I., Papadimitrakopoulos F., Rusling J.F. (2003) *Electrochem. Commun.* 5, 408.

[Yue und Waldeck 2005]

Yue H., Waldeck D.H. (2005) *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 9, 28.

[Yue *et al.* 2008]

Yue H., Waldeck D.H., Schrock K., Kirby D., Knorr K., Switzer S., Rosmus J., Clark R.A. (2008) *J. Phys. Chem. C* 112, 2514.

[Zhang *et al.* 2007]

Zhang Y.-B., Kanungo M., Ho A.J., Freimuth P., van der Lelie D., Chen M., Khamis S.M., Datta S.S., Johnson A.T.C., Misewich J.A., Wong S.S. (2007) *Nano Letters* 7, 3086.

[Zayats *et al.* 2002]

Zayats M., Katz E., Willner I. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124, 14724.

[Zhou *et al.* 2004]

Zhou J., Zheng J., Jiang S. (2004) *J. Phys. Chem. B* 108, 17418.

Anhang

Sequenz von *pJRhrsN2*:

```

1      TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGTCCCGGAGACGGTCA 60
      AGCGCGCAAAGCCACTACTGCCACTTTTGGAGACTGTGTACGTCGAGGGCCTCTGCCAGT

61      CAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTG 120
      GTCGAACAGACATTTCGCCTACGGCCCTCGTCTGTTCTGGGCAGTCCCGCGCAGTCGCCAC

121     TTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGC 180
      AACCGCCACAGCCCCGACCGAATTGATACGCCGTAGTCTCGTCTAACATGACTCTCACG

                                                    lacZ reporter(239,396)
                                                    |
                NdeI                                NarI
                |                                | |
181     ACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCC 240
      TGGTATACGCCACACTTTATGGCGTGTCTACGCATTCTCTTTTATGGCGTAGTCCGCGG

241     ATTCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTAT 300
      TAAGCGGTAAGTCCGACGCGTTGACAACCCTTCCCGCTAGCCACGCCCCGAGAAGCGATA

301     TACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGT 360
      ATGCGGTCGACCGCTTTCCCCCTACACGACGTTCCGCTAATTCAACCCATTGCGGTCCCA

                                                    AccI
                                                    |
                                                    HindIII   PstI
                                                    |       | |
361     TTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGGCTGCAGGTCGACGA 420
      AAAGGGTCAGTGCTGCAACATTTTGCTGCCGGTCACGGTTCGAACCGACGTCCAGCTGCT

421     GTGATATTTCCAATTTGGGAAATTTCCCAAATCAGTAATGTAGCCTCTACGGGTGTCTCT 480
      CACTATAAAGGTTAAACCCTTTAAAGGGTTTAGTCATTACATCGGAGATGCCACAGAGA

481     GTCAGCCCCGTGGTCGCCAGCACAGAATGTATCGTACCCCTGAAGGTAGTTTTTTACCGC 540
      CAGTCGGGGCACCAGCGGTCGTGTCTTACATAGCATGGGGACTTCCATCAAAAAATGGCG

541     CGTGGCACAGATAAAGGTGCACCTTGTGATAATAAGGTGGAAAAATATATATGAAAAAGT 600
      GCACCGTGTCTATTTCCACGTGGAACACTATTATTCCACCTTTTTATATATACTTTTTCA

601     GAAATTGATTGTGGCTGCACTAGGACATCATTATTTCTTACTTGGCTATTTACACGTACT 660
      CTTTAACTAACACCGACGTGATCCTGTAGTAATAAAGAATGAACCGATAAATGTGCATGA

                ORF(1) rf(4)(680,1504)
                |
661     TACGCTGGCTGTATATCATTTAAGGGGCGGAGGACGAAGAGGACGGACCCGAGATCATCC 720
      ATGCGACCGACATATAGTAAATTCCCCGCCTCCTGCTTCTCCTGCCTGGGCTCTAGTAGG

                                                    XbaI
                                                    |
721     GGTCCAAGAAACGGGTCATCCGGTCCTTAGCATTGTCTAGACTATCTAGGGCAGGACGGA 780
      CCAGGTTCTTTGCCAGTAGGCCAGGAATCGTAACAGATCTGATAGATCCCGTCCTGCCT

```

ApaI
|

781 CATCCACGTGGAAGTAGGCATTCCGTTTTCGTCGTCGGGCCCTCCGTAGAAATCCAAGA 840
GTAGGTGCACCTTTTCATCCGTAAGGCAAAAGCAGCAGCCCGGGAGGCATCTTTAGGTTCT

841 CGTATCTAACTTCCTTGAAGGTTGGAGGTTGTTGTTCCGCTTTGCGCTCGCCTCGGAGTA 900
GCATAGATTGAAGGAACCTCCAACCTCCAACAACAAGGCGAAACGCGAGCGGAGCCTCAT

901 CAATCCAGTCGTGCCTGTGCAATGGTAGTTCTTGGCTAAAATGGGACGGAAACAGTAGGC 960
GTTAGGTCAGCACGGACAGCTTACCATCAAGAACCGATTTTACCCTGCCTTTGTCATCCG

961 CGCACAGGTGCATCCAGCGAGCACGAGGGCTCAATACGCCCGGTTTCCCATGAATTTCA 1020
GCGTGTCCACGTAGGTCGCTCGTGTCTCCGAGTTATGCGGGCCAAAGGGGTACTTAAAGT

1021 GCAACTTAGGCTGCACGTGGCTTTTCATCTGTGTGCGGTTTTTCCCATTCGAGCACTTCCT 1080
CGTTGAATCCGACGTGCACCGAAAGTAGACACACGCCAAAAAGGGTAAGCTCGTGAAGGA

NcoI
|

1081 GCCAGCACCTTCATTTAGAAAGTTGTGGACCTGCACCATGGACTCCACTGCATCTTCGG 1140
CGGTCGTGGGAAGTAAATCTTTCAACACCTGGACGTGGTACCTGAGGTGACGTAGAAGCC

1141 CGACTTCGCCGCTACCGCCAATCTTGCCCTTTCTAACCATAGCATTGTACATCTGTTGTG 1200
GCTGAAGCGGCGATGGCGGTTAGAACGGGAAAGATTGGTATCGTAACATGTAGACAACAC

1201 GAGAAGGATACTCCAGAACTCGTTACTGTCTGGACTCTTGGGGATGCTGGAGATGGTCC 1260
CTCTTCCTATGAGGGTCTTGAGCAATGACAGACCTGAGAACCCCTACGACCTCTACCAGG

1261 GATCAACGGGCAAGTCCATCTTTTTGGCCAGGCTGTTTGGATGCTGCCAACTCCGGCATAT 1320
CTAGTTGCCGTTTCAGGTAGAAAACCGGTCCGACAAACCTACGACGTTGAGGCCGTATA

1321 TGTTTCAGCGGGTTTTATTCTATCGTTATCTCCCTGCATAACGGGGCACTCAGAGGATGGTG 1380
ACAAGTCGCCCAAATAAGATAGCAATAGAGGGACGTATTGCCCCGTGAGTCTCTACCAC

1381 GCGACGACGACGACGACTCGTGCATGACTGGGCACCCTGACATGGATGATACTGCTGCCC 1440
CGCTGCTGCTGCTGCTGAGCACGTACTGACCCGTGGGACTGTACCTACTATGACGACGGG

EcoRI
|

1441 CACCAATATCTTTGCCCGTAGTTTTTTGATCTGCCCAAACCAACCCATTTTTTGTGAAT 1500
GTGGTTATAGAAACGGGCATCAAAAACTAGACGGGTTTTGGTTGGGTAAAAAACACTTA

ClaI
|

1501 TCATAGTATCGATACCCTCCTAAGTTTTGTAATCTATAAAGTTAGCAATTTAACTAAGTG 1560
AGTATCATAGCTATGGGAGGATTCAAACATTAGATATTTCAATCGTTAAATTGATTCAC

BamHI
|

1561 TAAAAACTTAGCTAGCTTACTAAAAAGATAATTACTGAAAAGCTAGCTTGCCCGGATCCA 1620
ATTTTTGAATCGATCGAATGATTTTTCTATTAATGACTTTTCGATCGAACCGGCCTAGGT

StuI
|

1621 GGCCTTATTCGTTAGTAGCCTTCTTCAAGTAAGCAATCAAGTCTTCTCTTTCAGTCTTCT 1680
CCGGAATAAGCAATCATCGGAAGAAGTTCATTTCGTTAGTTCAGAAGAGAAAGTCAGAAGA

E N T A K K L Y A I L D E R E T K K

```

1681 TCTTAATACCAGCGAAAATCATCTTAGTACCAGGAATGTACTTCTTTGGGTTTTCCAAGT 1740
    AGAATTATGGTCGCTTTTAGTAGAATCATGGTCCTTACATGAAGAAACCCAAAAGGTTCA

    K I G A F I M K T G P I Y K K P N E L Y

1741 ATTCCATCAAAGTTTTCTTCCTTCCAGGTGATACCCTTGTTCTTGTTAGCGTCAGTGTAAG 1800
    TAAGGTAGTTTTCAAAGAAGGAAGGTCCACTATGGGAACAAGAACAATCGCAGTCACATTC

    E M L T E E K W T I G K N K N A D T Y T

1801 TGAAACCTGGAGCTTGACCGGTCTTACGACCGAACAACCGTTCAAGTTTGACCGGTCT 1860
    ACTTTGGACCTCGAACTGGCCAGAATGCTGGCTTGTTTGGCAAGTTCAAACCTGGCCAGA

    F G P A Q G T K R G F L G N L N P G T K

                                XmnI
                                |
1861 TGTTCTTACCACCTTTTTTCGACAGTGTGACATTGAGCACACTTTTTGAACGAAAATCTTCT 1920
    ACAAGAATGGTGGAAGGCTGTCACTGTAACCTCGTGTGAAACTTGCTTTTAGAAGA

    N K G G K E V T H C Q A C K Q V F I K K

                                SmaI
                                |
                                XmaI      KpnI      EcoRI
                                |      |      |
                                ||     ||     ||
1921 TACCCTTTTCAACGTCACCCATTATGTTTCTCCTTACCCGGGTACCGAGCTCGAATTCTG 1980
    ATGGGAAAAGTTGCAGTGGGTAATACAAAGGAGGAATGGGCCCATGGCTCGAGCTTAAGC

    G K E V D G M |<<

                                lac prom(2038,2067)
                                |
1981 TAATCATGGTCATAGCTGTTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAAC 2040
    ATTAGTACCAGTATCGACAAAGGACACACTTTAACAATAGGCGAGTGTTAAGGTGTGTTG

2041 ATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACA 2100
    TATGCTCGGCCTTCGTATTTACATTTTCGGACCCACGGAATTACTCACTCGATTGAGTGT

2101 TTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCAT 2160
    AATTAACGCAACGCGAGTGACGGGCGAAAGGTCAGCCCTTTGGACAGCACGGTCGACGTA

2161 TAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCC 2220
    ATTACTTAGCCGTTGCGCGCCCCTCTCCGCCAAACGCATAACCCGCGAGAAGGCGAAGG

2221 TCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCA 2280
    AGCGAGTGACTGAGCGACGCGAGCCAGCAAGCCGACGCCGCTCGCCATAGTCGAGTGAGT

2281 AAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCA 2340
    TTCCGCCATTATGCCAATAGGTGTCTTAGTCCCCTATTGCGTCCTTTCTGTACACTCGT

                                pBR322 origin(2376,2995)
                                |
2341 AAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGG 2400
    TTTCCGGTCGTTTTCCGGTCCTTGGCATTTCGCGCGCAACGACCGCAAAAAGGTATCC

```

2401 CTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCG 2460
 GAGGCGGGGGGACTGCTCGTAGTGTCTTTTAGCTGCGAGTTCAGTCTCCACCGCTTTGGGC
 2461 ACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTT 2520
 TGTCTGATATTTCTATGGTCCGCAAAGGGGGACCTTCGAGGGAGCACGCGAGAGGACAA
 2521 CCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCCTT 2580
 GGCTGGGACGGCGAATGGCCTATGGACAGGCGGAAAGAGGGAAGCCCTTCGCACCGCGAA
 2581 TCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAAGTTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGC 2640
 AGAGTATCGAGTGCGACATCCATAGAGTCAAGCCACATCCAGCAAGCGAGGTTTCGACCCG
 2641 TGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTT 2700
 ACACACGTGCTTGGGGGGCAAGTCGGGCTGGCGACGCGGAATAGGCCATTGATAGCAGAA

 AlwNI
 |
 2701 GAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATT 2760
 CTCAGGTTGGGCCATTCTGTGCTGAATAGCGGTGACCGTCGTCGGTGACCATTGTCCTAA
 2761 AGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGC 2820
 TCGTCTCGCTCCATACATCCGCCACGATGTCTCAAGAACTTCACCACCGGATTGATGCCG
 2821 TACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAA 2880
 ATGTGATCTTCCTGTCATAAACCATAGACGCGAGACGACTTCGGTCAATGGAAGCCTTTT
 2881 AGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTT 2940
 TCTCAACCATCGAGAACTAGGCCGTTTGTGGTGGCGACCATCGCCACCAAAAAAACAA
 2941 TGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCT 3000
 ACGTTTCGTGCTAATGCGCGTCTTTTTTCTAGAGTTCTTCTAGGAACTAGAAAAAGA
 3001 ACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTA 3060
 TGCCCCAGACTGCGAGTCACCTTGCTTTTGAAGTGAATTCCTAAAACAGTACTCTAAT
 3061 TCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAA 3120
 AGTTTTTCTAGAAAGTGGATCTAGGAAAATTTAATTTTACTTCAAAATTTAGTTAGATT

 ORF(2) rf(6)(3150,4010)
 |
 amp marker(3150,4010)
 |
 3121 AGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATC 3180
 TCATATATACTCATTTGAACCAGACTGTCAATGGTTACGAATTAGTCACTCCGTGGATAG
 3181 TCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACT 3240
 AGTCGCTAGACAGATAAAGCAAGTAGGTATCAACGGAAGTGAAGGGGAGCAGACATCTATTGA
 3241 ACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGC 3300
 TGCTATGCCCTCCGAATGGTAGACCGGGGTACGACGTTACTATGGCGCTCTGGGTGCG
 3301 TCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGT 3360
 AGTGGCCGAGGTCTAAATAGTCGTTATTTGGTCGGTCGGCCTTCCCGGCTCGCGTCTTCA
 3361 GGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTA 3420
 CCAGGACGTTGAAATAGGCGGAGGTAGGTGAGATAATTAACAACGGCCCTTCGATCTCAT

```

3421 AGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTG 3480
      TCATCAAGCGGTCAATTATCAAACGCGTTGCAACAACGGTAACGATGTCCGTAGCACCAC

3481 TCACGCTCGTCGTTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTT 3540
      AGTGCGAGCAGCAAACCATAACCGAAGTAAGTCGAGGCCAAGGGTTGCTAGTTCCGCTCAA

3541 ACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTC 3600
      TGTACTAGGGGGTACAACACGTTTTTTTCGCCAATCGAGGAAGCCAGGAGGCTAGCAACAG

3601 AGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTT 3660
      TCTTCATTCAACCGGCGTCACAATAGTGAGTACCAATACCGTCGTGACGTATTAAGAGAA

3661 ACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATT 3720
      TGACAGTACGGTAGGCATTCTACGAAAAGACACTGACCACTCATGAGTTGGTTCAGTAAG

3721 TGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACC 3780
      ACTCTTATCACATACGCGCTGGCTCAACGAGAACGGGCCGAGTTATGCCCTATTATGG

3781 GCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAA 3840
      CGCGGTGTATCGTCTTGAAATTTTCACGAGTAGTAACCTTTTGCAAGAAGCCCCGCTTTT

3841 CTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCAAC 3900
      GAGAGTTCCTAGAATGGCGACAACCTCTAGGTCAAGCTACATTGGGTGAGCACGTGGGTTG

3901 TGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAA 3960
      ACTAGAAGTCGTAGAAAATGAAAGTGGTCGCAAAGACCCACTCGTTTTTTGTCCTTCCGTT

3961 AATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTT 4020
      TTACGGCGTTTTTTCCCTTATTCCCGCTGTGCCTTTACAACCTATGAGTATGAGAAGGAA

                                amp prom(4052,4080)
                                |
4021 TTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAA 4080
      AAAGTTATAATAACTTCGTAAATAGTCCCAATAACAGAGTACTCGCCTATGTATAAACTT

4081 TGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCACCT 4140
      ACATAAATCTTTTTATTTGTTTATCCCAAGGCGCGTGTAAGGGGCTTTTTCACGGTGGA

4141 GACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGG 4200
      CTGCAGATTCTTTGGTAATAATAGTACTGTAATTGGATATTTTTATCCGCATAGTGCTCC

4201 CCCTTTCGTC 4210
      GGGAAAGCAG

```

Erstellt mit PlasMapper Version 2.0 [Dong *et al.* 2004].

Sequenz des synthetischen Pferdeherz Cyt c (opticytc):

```

      EcoRI      KpnI   PstI                               His Tag      Xa Protease
      |          |     |                               -----|-----
1    GAATTCGGTACCCTGCAGTAAGGAGGAAATATTATGCATCACCATCACCACCATATCGAA 60
    CTTAAGCCATGGGACGTCATTCCTCCTTTATAATACGTAGTGGTAGTGGTGGTATAGCTT
                                >>|
1                                M H H H H H H I E

                                XmnI
                                |
61    -----
    GGTTCGTCAAGGCGATCCGGAGAAAGGTAAGAAAATCTTCGTGCAGAAATGCGCCCAGTGC 120
    CCAGCAGTCCCGCTAGGCCTCTTTCCATTCTTTTAGAAGCACGTCTTTACGCGGGTCACG

10    G R Q G D P E K G K K I F V Q K C A Q C

      DraIII                               AvaII                      SfiI
      |                               |                               |
121   CACACCGTGGAAAAAGGTGGCAAAAACAAAACGGGTCCGAACCTGAACGGCCTGTTTCGGC 180
    GTGTGGCACCTTTTTCCACCGTTTTTGTTTTGCCAGGCTTGGACTTGCCGGACAAGCCG

30    H T V E K G G K N K T G P N L N G L F G

                                AccI
                                |
181   CGTAAAACCGGCCAAGCACCGGGCTTCACGTATACCGATGCGAACAAGAATAAAGGCATC 240
    GCATTTTGGCCGGTTCGTGGCCCGAAGTGCATATGGCTACGCTTGTTCTTATTTCCGTAG

50    R K T G Q A P G F T Y T D A N K N K G I

                                                SmaI
                                                |
                                                XmaI
                                                |
241   ACCTGGAAAGAAGAGACCCTGATGGAATACCTGGAAAATCCACAGGCGTACATCCCAGGGC 300
    TGGACCTTTCTTCTCTGGGACTACCTTATGGACCTTTTAGGTGTCCGCATGTAGGGCCCG

70    T W K E E T L M E Y L E N P Q A Y I P G

301   ACCCGTATGATCTTTGCGGGCATCAAGAAAAAGACCGAACGCGAAGATCTGATCGCGTAT 360
    TGGGCATACTAGAAACGCCCGTAGTTCTTTTCTGGCTTGCGCTTCTAGACTAGCGCATA

90    T R M I F A G I K K K T E R E D L I A Y

                                BamHI
                                |
                                HindIII
                                |
361   CTGAAAAAAGCGACCAACGAATAATAAGCTTGGATCC 397
    GACTTTTTTCGCTGGTTGCTTATTATTTCGAACCTAGG

110   L K K A T N E

```

Abkürzungsverzeichnis

0D	0-dimensional
1D	1-dimensional
2D	2-dimensional
3D	3-dimensional
α	Durchtrittsfaktor; Parameter für die reduzierte Masse der Elektronen
A_0	Grundfläche
A_{3D}	3D Oberfläche
Abb.	Abbildung
AFM	Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope)
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Au	Gold
Au(111)	Gold (111)
Au_{Nano}	Au Nanopartikel
Az	Azurin
β	Tunneling Decay Parameter
b	y-Achsenabschnitt im Laviron Diagramm
BE	Bottomelektrode
B_n	Bedeckungsgrad
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
c	Konzentration
C-AFM	Kontakt AFM
c_{DL}	Doppelschichtkapazität
Cys	Cystein
Cyt c	Cytochrom c
ΔR	Änderung der Reflektivität
d	Abstand; Durchmesser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
d_{NP}	Nanopillardurchmesser
DTE	Dithioerythritol
E	Potential
e	Elementarladung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E_0	Formalpotential
ECSTM	Elektrochemisches STM
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid

EG	Ethylenglykol
F	Faradaykonstante
FcHxT	6-(Ferrocenyl)hexanthiol
GOx	Glukoseoxidase
GST	Glutathion-S-Transferase
$\hbar$	„reduziertes Plancksches Wirkungsquantum“
H ₂ O _{bidest}	Deionisiertes Wasser bidestilliert
His	Histidin
h_{NP}	Nanopillarhöhe
HOMO	highest occupied molecular orbital
HxT	1-Hexanthiol
I	Strom; Ionenstärke
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
J	Stromdichte
k_0	Standardgeschwindigkeitskonstante
λ	Wellenlänge
LB	Luria-Bertani-Medium
LMW	Low Molecular Weight
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
Lys	Lysin
m	Steigung des linearen Bereiches im Laviron Diagramm
m_e	Masse des Elektrons
MBA	Mercaptobenzoessäure
MBP	Maltose Bindungsprotein
MEOH	2-Mercaptoethanol
Met	Methionin
MHA	6-Mercaptohexansäure
MilliQ	Deionisiertes, hochreines Wasser
MP-11	Microperoxidase-11
MPA	3-Mercaptopropionsäure
MPhOH	4-Mercatophenol
MPOH	3-Mercaptopropanol
MUA	11-Mercaptoundecansäure
n	Oberflächenbedeckung; Anzahl Elektronen
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
$n_{C-Atome}$	Anzahl Kohlenstoffatome
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NP	Nanopillar
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
ox	Oxidation; oxidiert
φ	Barrierehöhe
PDEA	Pyridinyldithioethamin

R	Widerstand; allgemeine Gaskonstante
red	Reduktion; reduziert
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
σ	Flächenladungsdichte
SAM	Selbstorganisierende Monolage
SCE	Standard Calomel Elektrode
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie
STM	Rastertunnelmikroskop (Scanning Tunneling Microscope)
SWCNT	Singlewall Carbon Nanotube
S_{xm}	Standardabweichung vom Mittelwert
T	Temperatur
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TE	Topelektrode
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TM	Tapping-Mode
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDT	1-Undecanthiol
ÜN	über Nacht
UQ	Ubichinon
UV/VIS	<i>ultraviolet/visible</i>
V	Potential
V_{Scan}	Potentialvorschubgeschwindigkeit
Wt	Wildtyp
x_{NP}	Abstand zwischen Nanopillars
YCC	Hefe Cytochrom c
z	Ladungszahl

Danksagung

Diese Arbeit entstand zwischen dem 1. Januar 2006 und dem 31. Dezember 2008 am Institut für Bio- und Nanosysteme (IBN-2) des Forschungszentrums Jülich unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas Offenhäusser und wurde von der Volkswagenstiftung unter Projektnummer I77-116 finanziell unterstützt.

Am Ende meiner Promotion blicke ich zurück auf drei sehr schöne und erfolgreiche Jahre. Aufgrund des freundlichen und angenehmen Arbeitsklimas habe ich mich von Beginn an sehr wohl gefühlt und bedauere, dass die Zeit nun bereits zu Ende geht. Es ist mir daher besonders wichtig mich bei all den Personen, die mich während dieser drei Jahre begleitet haben und die, in welcher Form auch immer, zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben herzlich zu danken.

An Erster Stelle richte ich meinen Dank an Prof. Dr. Andreas Offenhäusser, der mir die Möglichkeit gegeben hat am IBN-2 auf diesem überaus interessanten und spannenden Forschungsgebiet zu arbeiten und stets großes Interesse am Fortschritt meiner Arbeit zeigte.

Ganz besonders dankbar bin ich Dr. Dirk Mayer, der mich während der drei Jahre betreut hat, mir viel Freiraum bei der Gestaltung der Arbeit gab und mir, wann immer nötig, mit seinem Rat zur Seite stand. Ich danke ihm für den ausdauernden Einsatz bei der Durchsicht und Korrektur des Manuskriptes und dafür, dass er bei Fragen oder Problemen immer hilfsbereit zur Stelle war. Mit seiner Unterstützung hat er sehr zum Erfolg dieser interdisziplinären Arbeit beigetragen.

Ein ganz herzliches Dankeschön gebührt auch Prof. Dr. Arnd Baumann und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Dagmar Kaschuba und Sabine Balfanz, am Institut für Strukturbiochemie und Biophysik (ISB-1) des Forschungszentrums Jülich. Durch ihre große Hilfsbereitschaft und die Möglichkeit die Infrastruktur des ISB-1 zu nutzen, gelang es mir, die genetisch modifizierten Cytochrom c Konstrukte herzustellen. Prof. Dr. Arnd Baumann zeigte großes persönliches Interesse an meinem Thema und hat mich bei den molekularbiologischen Arbeiten sehr unterstützt.

Bei Prof. Dr. Lothar Elling bedanke ich mich für seine Bereitschaft diese Arbeit im Fachbereich Biologie der RWTH Aachen zu vertreten.

Ein großes Dankeschön gilt auch Nils Sanetra, der mir bei den experimentellen Arbeiten mit den Crossbarstrukturen sehr geholfen hat.

Für die vielen nützlichen Tipps und dafür, dass sie bei Fragen immer hilfreich zur Seite standen, danke ich Dr. Karolina Caban, Dr. Bernhard Wolfrum, Dr. Ranjita Ghosh Moulick und Dr. Fumio Nakamura.

Für die sehr gute und produktive Zusammenarbeit bei der Charakterisierung der Nanopillar Strukturen bedanke ich mich bei Dorothea Brüggemann, Dr. Youlia Mourzina und Michael Jansen.

Sehr zum Dank verpflichtet bin ich auch Rita Helpenstein, Marko Banzet, Elke Brauweiler-Reuters und Susanne Bippus für ihre großartige Hilfsbereitschaft bei vielen organisatorischen Dingen.

Bei den Mitarbeitern der technischen Werkstätten, insbesondere bei Herrn Strobl, Herrn Mertens und Herrn d'Orsaneo, sowie dem Elektronik-Labor und dem ZCH bedanke ich mich für die stets zügige Umsetzung technischer Entwürfe.

Für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen schönen Momente während der vergangenen drei Jahre danke ich allen Doktoranden und Diplomanten an unserem Institut, insbesondere Boris Hofmann, Stefan Eick, Frank Sommerhage, Jan Eschermann und Sandra Gilles.

I would like to thank Dr. Jon Rumbley from the Chemistry Department at the University of Minnesota for providing us the two recombinant expression vectors for horse heart cytochrome c.

Meiner Freundin Silvia und meiner Mutter gebührt mein Dank für ihren Eifer und Spürsinn bei der Suche nach Rechtschreibfehlern in diesem Manuskript. Bei meiner Freundin Silvia, meinen Geschwistern und meinen Eltern möchte ich mich ganz besonders und von Herzen dafür bedanken, dass ihr mich während all der Zeit so wunderbar unterstützt habt, immer für mich da wart und mir stets großen Rückhalt gegeben habt.

Lebenslauf und eigene Veröffentlichungen

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: **Schröper**
 Vorname: **Florian**
 Geburtsdatum: **25.01.1979**
 Ort der Geburt: **Köln**
 Staatsangehörigkeit: **Deutsch**



QUALIFIKATIONEN:

⇒ 1998	Abitur am "Gymnasiums Kreuzgasse" in Köln.
⇒ 1999 – 2005	Diplomstudiengang Biologie an der RWTH Aachen University, Abschluss: Diplom-Biologe ⇒ 08/2004 – 10/2005 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biotechnologie der RWTH Aachen University: <i>"Optimierung der enzymkatalysierten enantiomerenreinen Synthese von 3-Furoin und weiteren pharmazeutisch relevanten Benzoinen"</i> .
⇒ 2001 - 2005	Anstellung als Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der RWTH Aachen.
⇒ 02/2004 – 05/2004	Auslandspraktikum am Fraunhofer Center For Molecular Biotechnology in Newark, Delaware, USA.
⇒ 2006 – 2009	Promotion am Institut für Bio- und Nanosysteme 2 (IBN-2) des Forschungszentrums Jülich GmbH: <i>„Optimierte Immobilisierung von Redoxproteinen an funktionale Elektrodenoberflächen für die molekulare Bioelektronik“</i> . ⇒ 07/2006 Visit KIST Award 2006: Besuchsaufenthalt am „Korean Institute of Science and Technology“ in Seoul, Südkorea. ⇒ 10/2006 – 03/2009 Kollegiat der "International Helmholtz Research School on Biophysics and Soft Matter (BioSoft)".
⇒ Seit 06/2009	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie in Aachen.

EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN:

-
- ⇒ Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur optimierten Immobilisierung von Redoxproteinen an funktionalen Elektrodenoberflächen sollen ebenfalls veröffentlicht werden.
-
- ⇒ 09/2008: **Publikation:** Schröper F., Brüggemann D., Mourzina Y., Wolfrum B., Offenhäusser A., Mayer D.: *Analyzing the electroactive surface of gold nanopillars by electrochemical methods for electrode miniaturization*. *Electrochimica Acta* 2008, 53, 21, 6265-6272
-
- ⇒ 06/2008: **Poster**-Beitrag auf der Internationalen Konferenz "NanoBio Europe 2008" in Barcelona (Spanien): Schröper F., Mayer D., Offenhäusser A.: *Charge transfer characteristics of redox proteins on macroscopic and nanosized electrodes using novel immobilization strategies*.
-
- ⇒ 06/2008: **Vortrag** beim "3rd Euregio Workshop - AGEF Seminar Interfacial Electrochemistry" in Kerkrade (Niederlande): *Charge transfer characteristics of redox proteins on macroscopic and nanosized electrodes using novel immobilization strategies*.
-
- ⇒ 05/2008: **Poster**-Beitrag auf der Internationalen Konferenz „Nanoelectronics Days 2008“ in Aachen: Schröper F., Brüggemann D., Mourzina Y., Mayer D., Offenhäusser A.: *Elucidating common electrochemical methods to determine the electroactive surface area of gold nanopillars*.
-
- ⇒ 05/2008: **Poster**-Beitrag auf der Internationalen Konferenz „Nanoelectronics Days 2008“ in Aachen: Brüggemann D., Jansen M., Schröper F., Mayer D., Offenhäusser A., Mourzina Y.: *Nanostructured interfaces for bioelectronic systems*.
-
- ⇒ 10/2006: **Poster**-Beitrag auf der Internationalen Konferenz „Nanoelectronics Days 2006“ in Aachen: Schröper F., Nakamura F., Offenhäuser A., Mayer D.: *Adsorption behaviors of Protein onto Self-assembled Monolayer containing Ethylene glycol units*.
-
- ⇒ 01/2006: **Publikation:** Ansorge-Schumacher M.B., Greiner L., Schröper F., Mirtschin S., Hischer T.: *Operational concept for the improved synthesis of (R)-3,3'-furoin and related hydrophobic compounds with benzaldehyde lyase*. *Biotechnol. J.* 2006, 1, 564–568
-
- ⇒ 10/2005: **Poster**-Beitrag beim 9. Internationalen SFB-Symposium im Eurogress Aachen: Hischer T., Schröper F., Ansorge-Schumacher M.B.: *PVA-immobilized lyase and its application in organic solvents for batch and continuous production of chiral compounds by carboligation*.
-
- ⇒ 10/2003: **Poster**-Beitrag beim LifeTecXchange Kongress im Technologiezentrum Aachen: Ismar P., Schröper F., Hartmeier W.: *Application of *Saccharomyces cerevisiae* S288c nuclear gene deletion strain for alcoholic fermentation under aerobic conditions*.
-

Jül-4300
Juni 2009
ISSN 0944-2952