

Institut für Biochemie und Biologie  
Arbeitsgruppe Analytische Biochemie

---

**Proteinmultischichten und Proteinmutanten für neuartige empfindliche  
Superoxidbiosensoren**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
"doctor rerum naturalium"  
(Dr. rer. nat.)  
in der Wissenschaftsdisziplin Analytische Biochemie**

**eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam**

**von**

**Moritz Karl Beissenhirtz**

**Potsdam, den 28.04.2005**

*für meine Eltern und meinen Bruder*

*und vor allen anderen für*

*Claudia*

## Verwendete Abkürzungen

### Proteine:

Cytochrom c	Cyt.c
Superoxiddismutase	SOD
Xanthinoxidase	XOD

### Chemikalien:

Hypoxanthin	HX
Xanthin	X
1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)Carbodiimid	EDC
11-Mercaptoundecansäure	MUA
11-Mercaptoundecanol	MU
Poly(anilinsulfonsäure)	PASA
Poly(styrensulfonsäure)	PSS

### Methoden:

Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie	SPR
Quartzmikrowaagemessung	QCM

### Einheiten:

kDa	Kilo-Dalton
M	Molar
A	Ampere
V	Volt
m	milli- ( $10^{-3}$ )
$\mu$	mikro- ( $10^{-6}$ )
n	nano- ( $10^{-9}$ )

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	1
1.1	Genereller Überblick	1
1.2	Ziel dieser Arbeit	2
<b>2.</b>	<b>Literaturübersicht</b>	5
2.1	Das Superoxidradikal	5
2.2	Metalloproteine in der Natur	7
2.2.1	Hämproteine	8
2.2.2	Kupferhaltige Proteine	10
2.3	Proteinelektrochemie	11
2.4	Biosensorik	16
2.4.1	Begriff des Biosensors	16
2.4.2	Redoxproteine in der Biosensorik	17
2.5	Cytochrom c und Superoxiddismutase	18
2.5.1	Cytochrom c	18
2.5.1.1	Biochemische Eigenschaften	18
2.5.1.2	Elektrochemie	19
2.5.2	Superoxiddismutase	21
2.5.2.1	Biochemische Grundlagen	21
2.5.2.2	Elektrochemische Untersuchungen	24
2.6	Methoden der Superoxiddetektion	24
2.7	Superoxidgenerierung <i>in vitro</i>	27
2.8	Multischichtaufbau nach dem <i>Layer-by-layer</i> -Prinzip	28
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	32
3.1	Material	32
3.1.1	Chemikalien	32
3.1.2	Geräte	32
3.1.3	Puffer	33
3.2	Methoden	33
3.2.1	Elektrodenpräparation	33
3.2.2	Molekularbiologische und Proteinchemische Methoden	35
3.2.3	Analytische und sensorische Methoden	41

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	44
<b>4.1</b>	<b>Multischichtelektroden aus Cytochrom c und einem Polyelektrolyten</b>	44
4.1.1	Aufbau von Cyt.c/Polyelektrolyt-Multischichten	44
4.1.1.a	Vorversuche	45
4.1.1.b	Optimierung der Immobilisationsbedingungen	45
4.1.2	Elektrochemische Charakterisierung der Multischichtelektroden	48
	Diskussion	54
4.1.3	Mechanismus des Elektronentransportes in Cyt.c/PASA- Multischichten	56
4.1.3.a	Einbau elektro-inaktiver Apo-Cyt.c- Zwischenschichten	57
4.1.3.b	Verdünnung mit Apo-Cyt.c	59
4.1.3.c	Einfluss kovalenter Verknüpfungen im Multischichtassemblat	61
4.1.3.d	Einbau des Polytektrolyten PSS	62
	Diskussion	63
4.1.4	Anwendung als Superoxidsensor	65
4.1.4.1	Reaktion zwischen Superoxid und der Multischichtelektrode	67
4.1.4.2	Untersuchung der Sensitivität von Elektroden unterschiedlicher Schichtzahl	69
4.1.4.3	Untersuchung eines Modellantioxidans	72
4.1.4.4	Stabilität der Multischichtsensoren	73
4.1.4.5	Einfluss von Interferenzen	75

<b>4.2</b>	<b>Superoxidsensoren mit Mutanten der humanen Cu,Zn-Superoxiddismutase</b>	<b>77</b>
4.2.1	Das Protein M2E133QSOD als Ausgangspunkt für Mutationsstudien	78
4.2.2	Entwurf der Mutationen	80
4.2.3	Herstellung und Aufreinigung der SOD-Mutanten	82
4.2.4	Erzeugung und elektrochemische Charakterisierung von SOD-Elektroden	83
4.2.4.1	Elektrochemische Charakterisierung der SOD-Mutanten	88
4.2.4.2	Elektrochemische Untersuchung des Wildtyps	89
4.2.4.3	Mut1C auf einer MPA-modifizierten Elektrode	90
	Diskussion	91
4.2.5	Zyklovoltammetrische Studien der Interaktion von SOD-Elektroden mit dem Superoxidradikal	93
4.2.6	Amperometrische Superoxidmessungen mit SOD-Elektroden	95
4.2.6.1	Einfluss von Interferenzen	100
4.2.6.2	Stabilität der SOD-Elektroden	101
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>104</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>109</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Genereller Überblick

Das Superoxidradikal  $O_2^-$  hat in den letzten Jahren große Aufmerksamkeit in der medizinischen und pharmakologischen Forschung erhalten. Superoxid entsteht durch die Ein-Elektronen-Reduktion von Sauerstoff und kann in biologischen Systemen sowohl oxidierend als auch reduzierend wirken. Aufgrund seiner hohen Reaktivität wurde ein schädigender Einfluss auf Proteine, DNA und Lipidstrukturen festgestellt. Daher verfügen Zellen über multiple Abwehrsysteme enzymatischer und nicht-enzymatischer Natur, die den Radikalspiegel in der Zelle auf einem niedrigen Niveau halten. Unter dem Einfluss von Krankheit, Stress, exogenen Noxen und Strahlung wird diese Balance jedoch gestört, woraufhin radikalbedingte Schäden auftreten. Mittlerweile ist eine Beteiligung des Superoxidradikals unter anderem bei Krebs, Herzinfarkten und Schlaganfällen nachgewiesen worden, was die Bedeutung der genaueren Erforschung dieses Radikals illustriert. Ein besseres Verständnis der konkreten Interaktion des Radikals mit biologischen Systemen und des zeitlichen Ablaufs der Radikalbildung im Krankheitsfall kann gezielte Therapieansätze zur Minimierung des superoxidbedingten Schadens ermöglichen und somit zu Fortschritten bei der Bekämpfung entsprechender Erkrankungen allgemein führen.

Über die Nahrung nimmt der Mensch neben den primären Metaboliten auch viele Substanzen auf, die der Körper benötigt, um die Radikalbildung zu bekämpfen. Zu diesen Antioxidantien zählen einige Vitamine ebenso wie viele Vertreter der Stoffklassen Catechine, Flavone und verwandte Verbindungen. Die konstante Versorgung des Körpers mit derartigen Molekülen ist essentiell. Dies hat zu dem Trend geführt, in der Lebensmittelchemie durch Zusätze entsprechender Substanzen eine ausreichende Zufuhr an Antioxidantien zu gewährleisten. Auch in der Kosmetik werden derartige Radikalfänger

verwendet, da viele alterungsbedingte Hautschäden auf oxidativen Einfluss zurückzuführen sind. In beiden Fällen ist eine Charakterisierung der Effektivität derartiger Beimischungen durchzuführen, indem im Labor die Interaktion zwischen dem jeweiligen Produkt und dem Superoxidradikal quantitativ bestimmt wird, um Aussagen über den Wirkungsgrad der Antioxidantien treffen zu können.

Die erhebliche Toxizität des Radikals wird vom Körper selbst bei der Verteidigung gegen Fremdzellen genutzt, indem Makrophagen es gezielt gegen virusbefallene Zellen oder eindringende Bakterien freisetzen. Auch an Signalleitungsprozessen in der Zelle ist das Radikal beteiligt.

Zur Superoxiddetektion wurden in der Vergangenheit verschiedene Methoden wie Chromatographie, ESR spintrapping oder Chemilumineszenz verwendet. Die meisten dieser Ansätze beruhen auf indirekten Messansätzen und sind insbesondere für die *in vivo*-Messung der Radikalkonzentration nicht geeignet.

Ein vielversprechender Ansatz ist die Bioelektrochemie, bei der ein auf einer Elektrode immobilisiertes Protein mit dem Radikal spezifisch eine Redoxreaktion eingeht. Der dabei fließende Strom ändert sich in Echtzeit proportional zur Superoxidkonzentration und steht somit als Signal zur Verfügung. Dieses Verfahren wurde in der Vergangenheit erfolgreich mit dem Protein Cytochrom c demonstriert, welches als Monoschicht auf einer mit einem Thiol modifizierten Elektrode immobilisiert wurde und *in vivo* und *in vitro* als Sensorsystem eingesetzt werden konnte. Dabei wurde festgestellt, dass die Empfindlichkeit der Messung sich proportional zur Menge an immobilisiertem Protein verhielt.

Für das Verhalten von Proteinen in derartigen Elektrodensystemen sind die Grenzflächeneigenschaften der Elektrodenoberfläche entscheidend. Über verschiedene Ansätze kann heute eine Strukturierung auf molekularem Level vorgenommen werden, die eine kontrollierte Deposition der biologischen Schichten auf der Elektrode und damit eine genaue Charakterisierung des Verhaltens der Biomoleküle ermöglicht. Mit derartigen Elektrodenstrukturen können die Elektronentransferprozesse zwischen Protein und Elektrode detailliert untersucht werden, wodurch ein besseres Verständnis der biologischen Redoxprozesse erreicht werden kann.



## 1.2 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, neuartige Protein-Elektrodensysteme zur quantitativen Detektion des Superoxidradikals zu entwickeln. Der Aufbau der gewünschten Schichten an Protein auf der Elektrode war zu etablieren und nachzuweisen, die elektrochemischen Eigenschaften der neuen Elektrode waren zu charakterisieren und schließlich die Signalleitung Radikal-Protein-Elektrode zu analysieren, mit dem Ziel, die Empfindlichkeit der herkömmlichen Sensoren deutlich zu übertreffen.

Im ersten Teil der Arbeit sollte eine Cytochrom c-Multischichtelektrode nach der *Layer-by-layer*-Technik entwickelt werden, bei der auf einer Monoschichtelektrode alternierende Schichten von einem Polyelektrolyten und Cytochrom c aufgebracht wurden, um die Proteinbeladung der Sensoroberfläche gegenüber einer Monoschicht um ein vielfaches zu erhöhen. Hierfür war die Strukturierung der Schichten so zu gestalten, dass die Proteine in den Schichten in elektrochemischen Kontakt mit der Elektrode standen. Dieser heterogene Elektronentransfer war zu charakterisieren und für eine Anwendung als Superoxidbiosensor zu nutzen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte eine direkte Fixierung eines Proteins auf unmodifizierten Goldoberflächen zum Aufbau von elektroaktiven Proteinschichten genutzt werden.

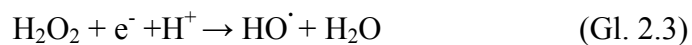
Mutanten des Enzyms Superoxiddismutase sollten gewonnen werden, welche ein oder zwei im Wildtyp nicht vorhandene Cystein-Reste enthielten. Diese können direkt auf Goldoberflächen chemisorbieren und somit den üblichen Elektrodenaufbau *Gold-Promotor-Protein* und die damit verbundenen limitierenden Faktoren, wie den Einfluss des Promotors, überwinden. Durch direkte Bindung des Proteins auf der Elektrodenoberfläche sollte eine Verringerung der Distanz zwischen dem aktiven Zentrum des Proteins und der Elektrodenoberfläche erzielt werden, um beste Bedingungen für den Elektronentransfer zwischen Protein und Elektrode zu erreichen.

Das Enzym Superoxiddismutase bietet sich auf Grund seiner hohen Selektivität gegenüber Superoxid für die Sensorik an, da Reaktionen mit anderen Substanzen nicht bekannt sind. Nach Charakterisierung der Elektronentransferprozesse sollten daher beide Teilreaktionen der Dismutation auf eine elektrochemische Detektion von Superoxidradikalen überprüft werden.

## 2. Literaturübersicht

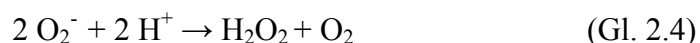
### 2.1 Das Superoxidradikal

Bei vielen aeroben Organismen wird zur Energiegewinnung Sauerstoff in der Atmungskette über mehrere Zwischenschritte mit insgesamt vier Elektronen reduziert und zu Wasser umgewandelt. Im Verlaufe dieses Prozesses können mehrere Intermediate auftreten, die in freigesetzter Form eine sehr schädliche Wirkung besitzen (Cadenas 1989; Fridovich 1998). Die univalente Reduktion von Sauerstoff führt oft schrittweise zu Superoxid ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und dem Hydroxylradikal ( $HO^\cdot$ ). Wasserstoffperoxid und das Hydroxylradikal entstehen dabei meist durch eine weitere Reduktion des Superoxids, welches als erste Spezies einer Radikalkaskade auftritt.



Dies kann neben den Reaktionen der Atmungskette (Brand et al. 2004; Han et al. 2001; St-Pierre et al. 2002) auch bei anderen biologischen Redoxreaktionen auftreten (Chung et al. 1997; Fridovich 1978; Wolin et al. 2002). Die Reaktionen der Elektronentransferketten in der pflanzlichen und bakteriellen Photosynthese können ebenfalls zur Entstehung von Superoxid führen (Liu et al. 2002; Marshall et al. 2002; Verkhovskii et al. 1985).

Superoxid kann in der Zelle univalente Reduktionen und Oxidationen durchführen und mit DNA, Proteinen und Lipiden reagieren, was Mutationen und Strangbrüche in der DNA (Misiaszek et al. 2004), Inaktivierung der Proteine (Sohal et al. 1995) und Schädigung von Membranen (Woods 2001) und Vesikeln (Ingold 2003) hervorrufen kann. Das Radikal kann spontan zu  $H_2O_2$  und  $O_2$  dismutieren (s. Gl. 2.4).

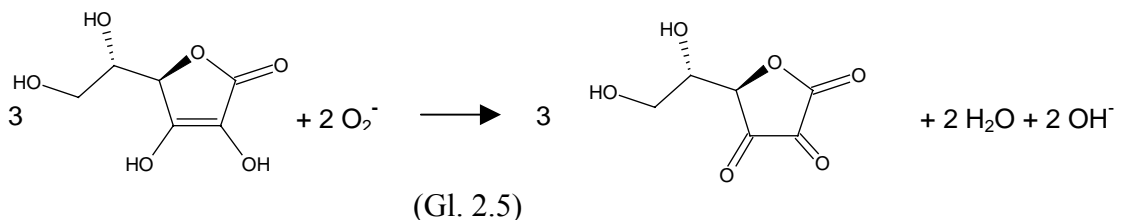


Seine Lebensdauer ist daher konzentrationsabhängig und liegt im Bereich von Millisekunden bis Sekunden (Fridovich 1972).

Wegen der Beteiligung von Protonen ist diese Dismutation pH-abhängig und besitzt bei pH 7,5 eine Geschwindigkeitskonstante von  $2,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Behar et al. 1970). Damit ist das Radikal in diesem pH-Bereich stabil genug, um eine Bedrohung der Zelle darzustellen (Datta et al. 2000). Die medizinische Forschung hat einen entscheidenden Einfluss des Radikals bei Erkrankungen wie Krebs (Kovacic und Jacintho 2001; Oberley 1991; Oberley und Buettner 1979), Herzbeschwerden (Mak und Newton 2001; Wattanapitayakul und Bauer 2001), dem Reperfusionssyndrom (Marklund 1988), neuraler Degeneration (Leonard 2001), Alzheimer (Mattson 2002; Todorich und Connor 2004), Parkinson (Liang und Patel 2004) und generellen Alterungsbeschwerden (Hensley und Floyd 2002; Youdim und Joseph 2001) festgestellt. Der Zusammenhang von Superoxid und oxidativem Stress im Körper wurde von McCord vor wenigen Jahren in einem Review dargelegt (McCord 2000).

Um die schädlichen Effekte dieses Radikals zu vermeiden, besitzt der Körper eine Reihe von Abwehrmechanismen, die vorhandene Radikale in weniger gefährliche Moleküle umwandeln. Zum einen kommt eine Reihe von Enzymen zum Einsatz: Superoxiddismutase zersetzt Superoxid zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid, welches eine geringere Bedrohung der Zelle darstellt und seinerseits von Peroxidasen und Catalase in Wasser und Sauerstoff oder ähnlich harmlose Moleküle umgewandelt wird, wodurch die oben angegebene Radikalkaskade unterbrochen wird. Zum anderen finden nicht-enzymatische Radikalfänger, sogenannte Antioxidantien, Einsatz, die mit dem Radikal eine Reaktion eingehen und dabei umgewandelt werden.

Ein typisches Beispiel ist die Ascorbinsäure (Afanasev et al. 1987; Nandi und Chatterjee 1987) deren mehrstufige Reaktion mit Superoxid kann folgendermaßen zusammengefasst werden kann (Nanni et al. 1980; Sawyer et al. 1982):



Diese nicht-enzymatischen Radikalfänger werden bei der Reaktion mit den Radikalen verbraucht und müssen, so sie nicht vom Körper synthetisiert werden können, über die

Nahrung zugeführt werden (Gordon 1996). Im gesunden Körper wird so die Superoxidkonzentration intrazellulär auf  $10^{-11}$  bis  $10^{-12}$  M gehalten.

Andererseits erfüllen das Superoxidradikal und die mit ihm verbundenen reaktiven Sauerstoffverbindungen Aufgaben für den Fortbestand des Organismus. So wird es gezielt zur Schädigung von eindringenden Bakterien genutzt (Subrahmanyam et al. 1991). Auch als Lieferant von  $H_2O_2$  kann Superoxid direkt in der Zelle hergestellt werden, etwa um die Umsetzung von Phenolen oder Lignin durch  $H_2O_2$ -abhängige Enzyme wie Peroxidasen und Ligninasen durchführen zu können (Hall et al. 1980; Halliwell 1978).

In den letzten Jahren wurde außerdem für verschiedene am oxidativen Stress beteiligte Moleküle eine Funktion in körpereigenen Signalsystemen festgestellt (Gamaley und Klyubin 1999; Thannickal und Fanburg 2000), was illustriert, dass die Balance zwischen Radikalen und Antioxidantien für die Lebensfähigkeit von Zellen außerordentliche Bedeutung besitzt. Auch diese Zusammenhänge bedürfen einer genaueren Untersuchung an Tiermodellen und Zellkulturen.

## 2.2 Metalloproteine in der Natur

Für das Verständnis biologischer Vorgänge ist das Studium von Struktur, Evolution und Funktion von Proteinen von größter Bedeutung. In biologischen Systemen sind sie für den Aufbau zellulärer Strukturen, die Energiegewinnung, den Stoffwechsel, die Zellteilung und die Reaktionen bei der Weitergabe der Erbinformation verantwortlich.

Eine wichtige Klasse dieser Biomakromoleküle sind Redoxproteine. Sie enthalten zusätzlich zum Aminosäuregerüst Kofaktoren, die Elektronen aufnehmen und abgeben können. Viele dieser Kofaktoren sind Metallionen, die entsprechend komplexiert am Protein gebunden sind und oft die katalytischen Zentren von Enzymen bilden oder die Struktur des Proteins entscheidend stabilisieren. Diese werden als Metalloproteine bezeichnet. Etwa die Hälfte aller in der *protein data bank* (PDB) registrierten Proteine enthalten Metallionen (Solomon et al. 2004). Auch nicht-metallische redoxaktive Kofaktoren spielen eine wichtige Rolle in der Biologie, etwa das Nicotinamidadenindinucleotid (NAD), Flavinnucleotide (FAD, FMN), Chinone und Pyrrolchinolinchinon (PQQ).

Redoxproteine nehmen eine zentrale Rolle in der Energiegewinnung durch Atmung und Gärung ebenso wie in der pflanzlichen und bakteriellen Photosynthese ein.

Die Bindung des Kofaktors im Proteingerüst verändert dessen Eigenschaften deutlich. Je nach Art der Komplexierung und der genauen Umgebung des Metallions kann die gleiche Gruppe in verschiedenen Proteinen unterschiedliche Aktivitäten und elektrochemische Eigenschaften besitzen.

Hill und Mitarbeiter unterteilten die Redoxproteine in *intrinsische* und *extrinsische* (Guo und Hill 1991). Intrinsische Redoxenzyme zeichnen sich durch ein katalytisches Zentrum im Innern der Polypeptidstruktur aus. Sie interagieren im Organismus mit kleinen Substratmolekülen, ohne einen Elektronentransfer zur Oberfläche des Enzyms zu benötigen. Extrinsische Redoxproteine hingegen tauschen in Rahmen ihrer biologischen Funktion Elektronen mit anderen Proteinen aus, indem die redoxaktiven Gruppen beider Proteine räumlich nah aneinander positioniert werden und somit die Elektronentransferreaktion im Oberflächenbereich stattfindet. Dies kann durch eine räumliche Annäherung von Protein und Elektrode nachgeahmt und damit für die Untersuchung der Redoxeigenschaften des Proteins genutzt werden.

### 2.2.1 Hämproteine

Etwa 5% der in der *protein data bank* veröffentlichten Kristallstrukturen enthalten eine Hämgruppe (Reedy und Gibney 2004). Hämproteine können Elektronentransferreaktionen und Substratoxidationen vornehmen, Metallionen einlagern und den Gastransport in Organismen durchführen. Insbesondere bei der Atmung und der daran gekoppelten Energiegewinnung spielen sie eine entscheidende Rolle (Sono et al. 1996).

Auf Grund der Lichtabsorption des Eisens sind viele Hämproteine stark farbig, was etwa die Färbung des Blutes durch das Hämoglobin verdeutlicht. Sauerstoffreiches und -armes Blut ist sogar mit bloßem Auge durch die unterschiedliche Färbung von sauerstofftragendem und -freiem Hämoglobin zu unterscheiden. Die Namensgebung vieler Hämproteine ist von dieser Farbigkeit inspiriert.

Bereits in späten 19. Jahrhundert wurden erstmalig die Hämproteine der Atmungskette als „Atmungspigmente“ oder „Myohematine“ von McMunn beschrieben (McMunn 1884). In den zwanziger Jahren des 20. Jahrhunderts klassifizierte Keilin diese Hämproteine als

*Cytochrome* (Keilin 1925), also „Zellfarbstoffe“, und unterteilte sie nach der untersten Absorptionsbande als Typ a (605 nm), Typ b (565 nm) und Type c (550 nm).

Die Hämgruppe besteht aus einem Tetrapyrrolringssystem (Protoporphyrin IX), in dessen Innerem ein Eisenatom an 4 Stickstoffe gebunden ist.

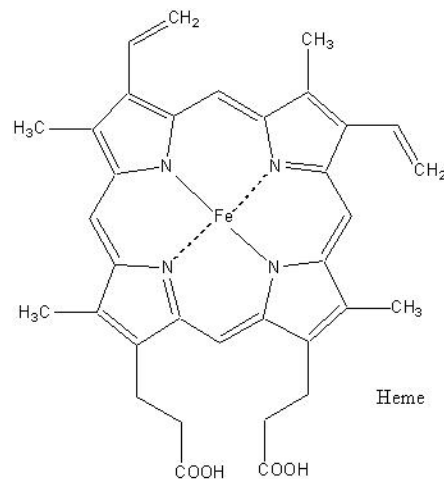


Abb. 2.1: Struktur der Hämgruppe

In der Natur treten am häufigsten die Formen Häm a bis d auf, die sich durch die Substitution der peripheren  $\beta$ -Pyrrolgruppen unterscheiden.

Das gebundene Eisen verfügt neben den 4 belegten Bindungsstellen über 2 weitere Koordinationsstellen, deren unterschiedliche Besetzung in verschiedenen Proteinen die Redoxaktivität und Biofunktionalität der Gruppe sehr unterschiedlich ausprägt und somit die Vielfalt der von den Hämproteinen erfüllten Aufgaben gewährleistet (Gunner et al. 1997). Im Verlauf von Redoxreaktionen kann das gebundene Eisen zwischen den Oxidationszuständen +II (Ferroform) und +III (Ferriform) wechseln, was für die Reaktivität der Hämproteine verantwortlich ist.

In der Gruppe der Häm c-Proteine ist die Hämgruppe durch Thioesterbindungen an den Schwefel von Cysteinresten an das Protein gebunden. Proteine der Gruppe Cytochrom c binden das Eisen oftmals zusätzlich durch Komplexierung mit Histidin und Methionin (Abbruzzetti et al. 2004; Tachiiri et al. 2004).

In komplexeren Hämproteinen sind mehrere Hämgruppen oder weitere Redoxkofaktoren vorhanden, die oft eine intramolekulare Elektronentransferkette bilden können.

Auf Grund der Redoxaktivität der prosthetischen Gruppe sind viele Hämproteine der Enzymklasse 1 (Oxidoreduktasen) zuzurechnen, welche im katabolischen sowie anabolischen Stoffwechsel und der Energiegewinnung Redoxreaktionen durchführen. Hämoglobin und Myoglobin hingegen sind Gastransportmoleküle, die durch Bindung von Gasmolekülen an die freie Koordinationsstelle des Eisens Sauerstoff in die Zellen hinein- und Kohlendioxid heraustransportieren. Dabei wird die Oxidationsstufe des Eisens nicht verändert, es findet also keine Redoxreaktion statt.

Obwohl in allen Fällen die gleiche prosthetische Gruppe vorhanden ist, liegt das formale Potential für den Übergang zwischen Ferro- und Ferriform in Abhängigkeit vom jeweiligen Protein zwischen -270 mV für Meerrettichperoxidase und +260 mV für Cytochrom c (jeweils bezogen auf die Normalwasserstoffelektrode).

### **2.2.2 Kupferhaltige Proteine**

Proteine mit Kupferatomen in ihrem reaktiven Zentrum erfüllen ebenfalls eine Reihe von physiologisch wichtigen Funktionen, insbesondere bei biologischen Redoxreaktionen. Fast ausschließlich treten sie im Metabolismus von Sauerstoff- und  $\text{NO}_x$ -Verbindungen auf (Solomon et al. 2001), wobei sie meist radikalische Substanzen oxidieren. Cu-Proteine sind an der bakteriellen Atmungskette beteiligt (Azurin), der Hydroxylierung und Oxidation phenolischer Verbindungen (Tyrosinase, Laccase) sowie der Oxidation von Catecholen, Aminophenolen und Eisen (Ceruloplasmin). Auch die Cytochrom c-Oxidase der Atmungskette enthält neben Hämgruppen ein Kupferzentrum.

In Biomolekülen tritt Kupfer fast ausschließlich in den Oxidationszuständen +I und +II auf, da der  $\text{Cu}(+II)/\text{Cu}(+III)$ -Übergang ein sehr hohes Redoxpotential besitzt (Solomon et al. 2001). Ähnlich wie bei den Hämproteinen ist auch im Falle der Cu-Proteine das formale Potential stark abhängig von der Proteinumgebung und der Liganden des Metallions (Battistuzzi et al. 1999).



Die Kupferzentren der Enzyme wurden nach ihrem Absorptionsverhalten in verschiedene Typen unterteilt (Solomon et al. 1992):

Proteine vom Typ 1 (*blue copper*) haben auf Grund der Bindung von Cystein-Schwefel am Kupfer ein deutliches Absorptionsband bei etwa 600 nm, das diese Proteine blau färbt.

Typ 2 (*normal copper*) zeigen meist ein relativ schwaches Absorptionsverhalten, während Proteine von Typ 3 (*binuclear copper*) zwei Cu-Atome in einem aktiven Zentrum besitzen und bei etwa 300 nm absorbieren. Multikupferproteine wie Ascorbatoxidase und Ceruloplasmin können eine Kombination der verschiedenen Cu-Zentrentypen enthalten.

Einige Beispiele sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Protein	Cu-Atome (typischerweise; pro Untereinheit)	Reaktion
Aminoxidase	1	Oxidation von Aminen zu Aldehyden
Galactoseoxidase	1	Oxidation von Hydroxylverbindungen
Cytochrom Oxidase	1	Oxidation von Cyt.c
Superoxiddismutase	1	Dismutation von Superoxid
Tyrosinase	2	Hydroxylierung von Aromaten
Haemocyanin	2	Sauerstoffbindung
Laccase	3	Oxidation von Catecholen
Ascorbatoxidase	3	Oxidation von Ascorbat
Ceruloplasmin	3	Oxidation von Fe +II

Tabelle 2.1: Überblick über einige Cu-Enzyme und die von ihnen katalysierten Reaktionen, nach (Solomon et al. 2001)

### 2.3 Proteinelektrochemie

Die Bioelektrochemie bietet hervorragende Möglichkeiten, die Eigenschaften von Redoxproteinen und den Elektronenaustausch zwischen Proteinen und niedermolekularen Verbindungen zu studieren, um daraus Erkenntnisse über die Funktionsweise und Charakteristika der Proteine zu gewinnen. Dies kann für praktische Anwendungen, wie Sensorik, Synthesereaktionen oder gar Energiespeicher- und -produktionssysteme wie die *bio-fuel cell* (Katz und Willner 2003) genutzt werden.

Hierbei wird meist die Interaktion des Proteins mit Elektrodenoberflächen untersucht. Prinzipiell sind zwei Fälle zu unterscheiden: Zum einen kann das Biomolekül in Lösung vorliegen und mit der Elektrode diffusionslimitiert Elektronen austauschen. Zum anderen werden Proteine auf Elektrodenoberflächen immobilisiert und führen so in räumlicher Nähe Redoxreaktionen mit der Elektrode durch. Dies bietet große Vorteile für Sensorik und andere technische Anwendungen, weil dadurch die Limitierung des Elektronentransfers durch die sonst nötige Diffusion des Biomoleküls durch die Lösung zur Elektrodenoberfläche vermieden wird.

Eine bedeutende Hürde bei der elektrochemischen Untersuchung von Proteinen war die Tatsache, dass diese an unbehandelten Metalloberflächen irreversibel adsorbieren und denaturieren, so dass die Elektrodenoberfläche passiviert wird (Allen et al. 1997) und ein schneller Elektronentransfer mit dieser Methode kaum erreichbar ist (*biofouling*). Eine Möglichkeit, dies zu vermeiden, ist der Einsatz von Mediatoren (Fultz und Durst 1982; Kano und Ikeda 2000), niedermolekularen redoxaktiven Molekülen, die mit dem Protein in Lösung interagieren und anschließend mit der Elektrodenoberfläche Elektronen austauschen, ohne zu adsorbieren oder die Redoxaktivität zu verlieren.

Eddowes und Hill erzielten in den siebziger Jahren einen entscheidenden Durchbruch, als sie die Modifizierung der metallenen Elektrodenoberfläche mit so genannten Promotoren vorstellten (Eddowes und Hill 1977). Als Promotoren bezeichnet man Moleküle, welche an der Elektrodenoberfläche gebunden werden und im untersuchten Potentialbereich selbst nicht elektroaktiv sind. Diese können eine günstige Orientierung des Proteins zur Elektrodenoberfläche erleichtern, was zur Bildung eines transienten Protein-Promotor-Elektrodenkomplexes (Allen et al. 1997) und dadurch zu einem schnellen, reversiblen Elektronenaustausch zwischen Protein und Elektrode führen kann, ohne eine Denaturierung hervorzurufen. Dies kann zum Studium von Proteinen in Lösung ebenso wie zur Immobilisierung von Proteinen auf der Promotorschicht durch geeignete Wechselwirkungen, etwa entgegengesetzte Ladungen, hydrophoben Effekten oder Wasserstoffbrückenbindungen, genutzt werden. Bei Bedarf kann durch Zugabe von *Crosslinkern* oder Aktivierungsreagenzien anschließend eine kovalente Bindung erreicht werden (Wagner et al. 1996). Dies ist auf Grund der erhöhten Stabilität des Systems insbesondere für sensorische Anwendungen deutlich vorteilhaft. In vielen Fällen bleibt dabei die biologische Funktion erhalten (Turkova 1999). Allerdings können durch eine

Immobilisierung Veränderungen der Struktur oder sonstiger Eigenschaften des Proteins auftreten. Somit ist eine genaue Charakterisierung der so erstellten Proteinelektrode zwingend notwendig.

Thiol-basierende Promotoren haben eine große Verbreitung erreicht, da sie durch eine einfache Inkubation chemisorptiv mit der Thiolgruppe an Goldoberflächen binden können (Porter et al. 1987), ohne dass aufwendige Reaktionsfolgen und Modifikationsschritte durchzuführen wären (*self-assembly*) (Bain et al. 1989). Besonders geeignet sind Promotoren des Typs  $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-R}^-$  oder  $-\text{R}^+$ , welche elektrostatische Wechselwirkungen der geladenen Endgruppe mit einer entsprechend entgegengesetzt geladenen Region des Proteins eingehen können, womit sogar eine Orientierung des Redoxzentrums des Proteins zur Oberfläche erreicht werden kann.

Willner und Mitarbeiter erarbeiteten ein Rekonstitutionssystem, bei dem der Promotor mit der prosthetischen Gruppe eines Enzyms modifiziert wird (Zayats et al. 2002). Eine Bindung des Apo-Enzyms an diese Einheit ermöglicht eine optimale Orientierung des wiederhergestellten Enzyms zur Elektrode.

Einen anderen Ansatz verfolgen Proteinelektroden, die mit Redoxpolymeren oder leitfähigen Polymeren (*conducting polymers*) modifiziert sind (Hiller et al. 1996; Schuhmann 1995). Meist findet eine Polymerisierung geeigneter Verbindungen direkt auf der Elektrodenoberfläche statt. Hierbei kann das Protein schon während der Polymerisationsreaktion beigemischt und somit in den Film integriert werden. Alternativ kann ein Protein auch adsorbtiv oder kovalent an funktionelle Gruppen des Polymers gebunden werden (Mao et al. 2003).

Attraktiv zur effizienten Weiterleitung von Elektronen vom Protein zur Elektrode ist die Möglichkeit, das Polymergerüst mit redoxaktiven Mediatoren wie Ferrocen oder Osmium auszustatten, die die Distanz zwischen dem Redoxzentrum des Proteins und der Elektrodenoberfläche verkürzen, indem sie eine Weiterleitung von Elektronen vom Protein zur Elektrodenoberfläche ermöglichen (Gros und Comtat 2004; Rajesh et al. 2004).

Membran- oder Detergenz-modifizierte Elektroden haben sich insbesondere bei der Untersuchung membrangebundener Proteine als erfolgreicher Ansatz erwiesen (Hall 1990).

In den letzten Jahren gewannen Elektrodensysteme mit Nanopartikeln und -röhren an Verbreitung. Hierbei können Biomoleküle direkt an derivatisierte Gruppen der Nanostrukturen gebunden und elektrochemisch charakterisiert oder sensorisch genutzt werden (Wang 2005).

Da in dieser Arbeit ausschließlich Goldelektroden Verwendung fanden, wird auf eine genauere Beschreibung anderer Elektrodentypen an dieser Stelle verzichtet.

Einige Beispiele für die Charakterisierung des direkten Elektronentransfers zwischen Kupfer- bzw. häm-haltigen Proteinen und verschiedenen dabei verwendeten Elektrodentypen sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Für eine detailliertere Übersicht sei hier auf einige ausführliche Arbeiten verwiesen (Christenson et al. 2004; Hanrahan et al. 1996; Ruzgas et al. 1996; Scheller et al. 2005; Yaropolov et al. 1996).

<b>Enzym</b>	<b>Aktives Zentrum</b>	<b>Elektrodenmaterial</b>	<b>Literaturstelle</b>
Azurin	Cu	Gold-Promotor, Gold (unmodifiziert), Glaskarbon	(Chi et al. 2000; Sakurai und Nose 1995; Sakurai et al. 1996)
Ceruloplasmin	6 Cu (T3,T1)	Graphitelektroden, Platin	(Yaropolov et al. 1996)
Plastocyanin	Cu	Gold-Promotor, Glaskarbon, Platin, Pyrolytisches Graphit	(Johnson et al. 2002; Sakurai und Nose 1995)
Laccase	4 Cu (T1, T2, T3)	Aktivierter Kohlenstoff, Gold	(Christenson et al. 2004; Kuznetsov et al. 2001; Shleev et al. 2005; Sun et al. 2004)
Tyrosinase	2 Cu (T2)	Aktivierter Kohlenstoff, Silber	(Sun et al. 2004; Ye und Zhou 1997)
Monoaminoxidase	1-3 Cu	Os-Redoxpolymer, Graphitelektroden	(Niculescu et al. 2000)
Bilirubinoxidase	4 Cu	Graphit-, Kohlenstoffelektroden	(Shleev et al. 2004; Tsujimura et al. 2004)
Myoglobin	Häm	Kohlenstoffnanoröhren, Glaskarbonelektrode	(Hanrahan et al. 1996; Kroning et al. 2004; Zhao et al. 2003)
Hämoglobin	Häm	Platin, Gold-Kolloid-Partikel, Kohlenstoffpaste, Kohlenstoffnanoröhren	(Gu et al. 2002; Hanrahan et al. 1996; Li et al. 2005)
Peroxidase	Häm	Gold (unmodifiziert), Graphit-Elektroden	(Ferapontova und Gorton 2001; Ruzgas et al. 1996; Schumacher et al. 2001)
Cyt. P450	Häm	Glaskarbon, Clay Nanopartikel	(Shumyantseva et al. 2004; Wirtz und Rivera 1999)
Cyt.b	Häm	Glaskarbon, Gold-Thioglykolat	(Wang et al. 1997; Wirtz und Rivera 1999)
Cyt.c Oxidase	2 Cu + 1 Häm + 1Cu/Häm	Gold-MPA, Glaskarbon	(Li et al. 1996; Rhoten et al. 2002)
Catalase	Häm	DDAB-Film, Pyrolytisches Graphit, Glaskarbon, Kohlenstoffnanoröhren	(Chen et al. 2001; Lai und Bergel 2002)
Alkoholdehydrogenase	4 Häm + PQQ	Polypyrrol, Os-modifiziertes Polyvinylpyridin	(Ramanavicius et al. 1999; Stigter et al. 1997)
Microperoxidase	Häm	Gold-Cystamin	(Lotzbeyer et al. 1994)
Cyt.c'	Häm	Gold-Promotor	(Ge et al. 2000)

Tabelle 2.2: Einige Beispiele für direkten Elektronentransfer von Cu- bzw. hämhaltigen Proteinen und verschiedene dafür verwendete Elektrodentypen.

## **2.4 Biosensorik**

### **2.4.1 Begriff des Biosensors**

Ein Biosensor ist laut IUPAC „a self-contained integrated device which is capable of providing specific quantitative or semi-quantitative analytical information using a biological recognition element (biochemical receptor) which is in direct spatial contact with a transducer element. A biosensor should be clearly distinguished from a bioanalytical system which requires additional processing steps, such as reagent addition. Furthermore, a biosensor should be distinguished from a bioprobe which is [...] disposable after one measurement” (Thevenot et al. 2001).

Diese sehr eng gefasste Definition schließt einige der erfolgreichsten bioanalytischen Systeme, wie etwa Einweg-Blutglucosesensoren, aus. In der Fachwelt wird daher ein Biosensor durch die enge räumliche Nähe des biologischen Erkennungselements zum Transducer und die Generierung eines elektrischen Signals aus der Interaktion zwischen Erkennungselement und Analyt definiert (Scheller et al. 2001). Die Fortschritte bei der Entwicklung biomimetischer Erkennungselemente hat dazu geführt, dass auch diese im Rahmen der Biosensorik untersucht und genutzt werden.

Prinzipiell ist jedes Biomolekül, das mit anderen Substanzen interagieren kann, zur biosensorischen Nutzung geeignet. In Tabelle 2.3 sind die am häufigsten verwendeten biologischen Erkennungselemente, ihre Interaktion mit Analytmolekülen und typische Arten der Signalgenerierung aufgelistet.

Erkennungselement	Interaktion mit Analyt	Möglicher Nachweis
Enzym	Katalytische Umsetzung	elektrochemisch, optisch, kalorimetrisch
Antikörper	Bindung, katalytische Umsetzung	direkt: gravimetrisch, optisch, kalorimetrisch indirekt: über elektrochemischen oder optischen Marker
Nukleinsäure	Hybridisierung, Bindung von Proteinen	elektrochemisch, gravimetrisch, optisch; indirekt durch Marker
Rezeptor	Bindung	optisch, konduktometrisch
Molecular Imprint	Bindung, katalytische Umsetzung	s. Antikörper
Aptamere	Bindung, katalytische Umsetzung	s. Antikörper

Tabelle 2.3: Überblick über in der Biosensorik häufig verwendete Erkennungselemente, ihre Interaktion mit Analytmolekülen und die Arten der Nachweise (nach Scheller et al. 2001)

#### 2.4.2 Redoxproteine in der Biosensorik

In elektrochemischen Biosensoren kommen redoxaktive Proteine im Wesentlichen zwei Funktionen nach. Zum einen kann das Protein als Erkennungselement mit dem Analyten direkt reagieren. Zur Signalgenerierung kann entweder ein direkter oder mediator-vermittelter Elektronentransfer zwischen Protein und Elektrode oder die enzymatische Generierung redoxaktiver Reaktionsprodukte genutzt werden. Diese Technik findet mittlerweile in vielen kommerziell erhältlichen Sensorsystemen Anwendung. Insbesondere die Blutzuckerbestimmung in der Patientenselbstkontrolle durch Glucose-umsetzende Enzyme kann als Standardbeispiel gelten. Der weltweite Markt derartiger Geräte wird für 2003 auf etwa 5 Mrd. Euro geschätzt.

Zum anderen können redoxaktive Proteine auch als Marker für die Untersuchung von Bindungsreaktionen, wie etwa in Immunoassays, dienen (Bier et al. 1997). Hierbei wird an den Antikörper, der das biologische Erkennungselement darstellt, ein redoxaktives Enzym gekoppelt. Bei erfolgreicher Bindung zwischen Analyt und Antikörper kann das

Reaktionsprodukt des Markerproteins, etwa  $\text{H}_2\text{O}_2$ , elektrochemisch nachgewiesen werden und ermöglicht so eine quantitative Analyse des Bindungsereignisses.

Mittlerweile wurde eine Vielzahl von Systemen zur Verbesserung der Empfindlichkeit sowie zur Analyse elektrochemisch schwer umsetzbarer Analytmoleküle entwickelt. Das Redox-Recycling erlaubt eine deutliche Signalverbesserung, indem ein enzymgeneriertes elektrochemisch umsetzbares Molekül in einem Kreislauf zwischen Anode und Kathode reduziert und sofort reoxidiert wird, was die Menge an fließenden Elektronen und damit das Sensorsignal spürbar erhöht (Hall 1990). Andererseits erlauben Sensoren mit mehreren hintereinander gekoppelten Enzymen die schrittweise, mehrstufige Umsetzung eines Analyten in ein sensorisch detektierbares Molekül (Mak et al. 2003).

## **2.5 Cytochrom c und Superoxiddismutase**

### **2.5.1 Cytochrom c**

#### **2.5.1.1 Biochemische Eigenschaften**

Das Protein Cytochrom c (Cyt.c) dient in der Atmungskette an der mitochondrialen Membran als Elektronenüberträger zwischen der Cytochrom-Reduktase und der Cytochrom-Oxidase. Es ist ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 13 kDa und enthält eine Häm-Gruppe, deren Eisenatom als Fe(III) (oxidiert) und Fe(II) (reduziert) vorliegen kann (Mathews 1985). Durch chemische Modifikation und Mutationsstudien wurde der Bindungsmechanismus zwischen dem Cyt.c und seinen Reaktionspartnern untersucht (Dopner et al. 1999). Der Elektronenaustausch zwischen den Proteinen bedarf einer großen Nähe zwischen den elektronenakzeptierenden und – abgebenden Gruppen, wobei die asymmetrische Ladungsverteilung des Cyt.c-Moleküls für die Lokalisierung des Proteins an seinem Reaktionspartner eine entscheidende Rolle spielt (Brautigan et al. 1978a; Brautigan et al. 1978b; Ferguson-Miller et al. 1978; Kang et al. 1978). Nahe der Hämgruppe wurden mehrere Lysinreste identifiziert, deren positive Ladungen für die Bindung an die Reaktionspartner in der Atmungskette ausschlaggebend sind. Eine Substitution dieser Reste durch andere Aminosäuren oder eine chemische Modifikation kann die Bindung zwischen Cyt.c und Cytochrom-Oxidase verhindern.



Cyt.c ist nach der Systematik von Hill als extrinsisches Enzym einzuordnen (Guo und Hill 1991). Neben den natürlichen Reaktionspartnern der Atmungskette sind weitere Reaktionen mit anderen Proteinen (Jin et al. 1996) und ein schneller Elektronenaustausch mit anderen Cyt.c-Molekülen beschrieben (Dryhurst et al. 1982).

### **2.5.1.2 Elektrochemie**

Cyt.c ist eines der am besten elektrochemisch charakterisierten Proteine. Es diente als Modellprotein für die elektrochemische Untersuchung von Redoxproteinen auf Grund von Vorteilen wie der geringen Größe, guten Löslichkeit, preiswerten Präparation in ausreichenden Mengen und dem Vorliegen als Monomer. Insbesondere hat sich der Elektronentransfer über die exponierte Häm-Ecke (Stellwagen und Cass 1975) als vorteilhaft erwiesen.

An unmodifizierten Metallelektroden ist eine denaturierende Adsorption von Cyt.c selbst bei sehr aufwendiger Präparation kaum zu vermeiden. Bei Verwendung von Promotor-modifizierten Elektroden hingegen zeigt Cyt.c einen schnellen, quasi-reversiblen Elektronentransfer. Über erste erfolgreiche Untersuchungen dieser Art wurden durch Einsatz von (4,4'-bipyridyl)- und (4-pyridyl)Disulfid (Eddowes und Hill 1977; Taniguchi et al. 1982; Xie und Dong 1992) auf Goldelektroden in den siebziger und achtziger Jahren berichtet. Inzwischen sind über 50 verschiedene Promotoren erfolgreich für den Elektronentransfer zwischen Cyt.c und Goldelektroden verwendet worden (Allen et al. 1984).

Sehr erfolgreich wurden hier bifunktionelle Alkanthiole mit negativ geladenen Carboxylgruppen verwendet (Avila et al. 2000; Song et al. 1993; Tarlov und Bowden 1991), welche von der Elektrodenoberfläche in die Lösung ragen und dort mit den positiv geladenen Lysinresten in der direkten Umgebung der Häm-Gruppe des Proteins elektrostatische Bindungen eingehen können (Frew und Hill 1988). Ein solcher Aufbau ist schematisch in Abb. 2.2 dargestellt. Diese Anordnung soll der Orientierung zwischen Cyt.c und Cytochrom-Oxidase in der Atmungskette ähneln, welche ebenfalls von den häm-nahen Lysinresten bestimmt wird, die evolutionär konserviert sind (Eddowes et al. 1979).

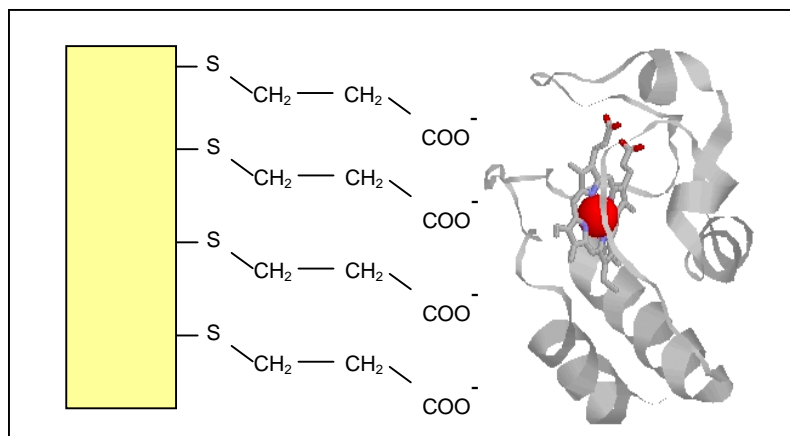


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Immobilisierung von Cyt.c an einer alkanthiol-modifizierten Goldoberfläche

Eine entscheidende Rolle für die Eigenschaften einer solchen Cyt.c-Elektrode spielt dabei die Kettenlänge der Alkanthiole, d.h. die Zahl der CH<sub>2</sub>-Gruppen. Bei einer Länge von mehr als 8 solchen Gliedern sinkt die Geschwindigkeitskonstante des heterogenen Elektronentransfers  $k_s$  entsprechend der Marcus-Theorie, exponentiell (Feng et al. 1997; Wei et al. 2002b). Bei kürzeren Verbindungen bleibt  $k_s$  unabhängig von der Kettenlänge, da dann andere Faktoren, etwa Reorganisationsprozesse des Proteins, die Geschwindigkeit des Elektronentransfers bestimmen.

Gleichzeitig fördert der Einsatz längerer Promotoren die Homogenität der selbstassemblierenden Promotorschicht, da hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Promotormolekülen stabilisierend wirken (Frew und Hill 1988). Für einen sensorischen Einsatz ist zum einen eine hohe Elektronentransferrate erforderlich, damit diese nicht limitierend auf den Sensor wirkt, zum anderen erhöht eine bessere Beladung der Oberfläche mit Proteinen die Empfindlichkeit des Systems, da es mehr Partner für die Reaktion mit dem Analyten bereitstellt. Als sehr günstig hat sich die Verwendung von Mercaptoundecansäure erwiesen (Lisdat et al. 1999), die noch ein ausreichend hohes  $k_s$  gewährleistet und gleichzeitig die Oberfläche der Goldelektrode mit einer Art Film überzieht, der die Diffusion von nicht-Analyt-Molekülen zur Goldoberfläche behindert (Shen et al. 1997). Der Umsatz solcher möglicherweise redoxaktiver Stoffe würde das Messsignal verfälschen und somit eine sensorische Anwendung limitieren.

An einer Mercaptoundecansäure-Monoschicht immobilisiertes Cyt.c erwies sich als stabil und elektroaktiv (Scheller et al. 1999). Adsorbiertes Cyt.c erreichte eine Oberflächendichte von etwa 10-15 pmol cm<sup>-2</sup>, was etwa der Beladung einer Monoschicht entspricht. Nach

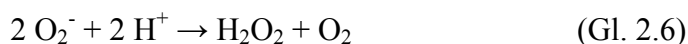
kovalenter Fixierung sank der Anteil an elektroaktivem Cyt.c auf etwa ein Drittel ab (Ge und Lisdat 2002), was durch ungünstige Orientierung oder Strukturänderung zu erklären ist. Die Geschwindigkeit des Elektronentransfers war vergleichsweise niedrig ( $k_s$  von  $4 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ ). Dies konnte durch die Verwendung von gemischten Promotorschichten, bei denen Mercaptoundecansäure im Verhältnis 1:3 mit Mercaptoundecanol gemischt wurde, verbessert werden. Das formale Potential für letzteren Fall lag bei  $-13 \pm 5 \text{ mV}$  für adsorbiertes bzw.  $3 \pm 5 \text{ mV}$  für kovalent immobilisiertes Cyt.c (Ge und Lisdat 2002), jeweils bezogen auf eine Ag/AgCl/1 M KCl-Referenzelektrode. Der  $k_s$ -Wert für kovalent fixiertes Protein lag bei  $40 \pm 6 \text{ s}^{-1}$ , die Beladung betrug mit  $9,2 \text{ pmol cm}^{-2}$  für das kovalent fixierte Protein kaum weniger als für adsorbiertes Cyt.c.

Wei und Mitarbeiter berichten von einem anderen Immobilisierungsansatz für Cyt.c (Wei et al. 2002a). Hierbei wird eine Goldelektrode mit thiol-basierten Promotoren modifiziert, die am lösungsnahen Ende eine Kopfgruppe tragen, welche am Häm des Proteins ligieren kann (Pyridin-, Imidazol- und Nitril-Gruppen). So wurde ein schneller Elektronentransfer mit  $k_s$ -Werten von bis zu  $850 \text{ s}^{-1}$  für eine Cyt.c-Monoschicht erreicht.

## **2.5.2 Superoxiddismutase**

### **2.5.2.1 Biochemische Grundlagen**

Alle Lebensformen, die mit Sauerstoff in Berührung kommen, benötigen ein Abwehrsystem gegen die leicht entstehenden Sauerstoffradikale. Das Enzym Superoxiddismutase (SOD) aus der Klasse der Oxidoreduktasen (EC 1.15.1.1) kann katalytisch Superoxid zersetzen (McCord und Fridovich 1969), wobei Sauerstoff und Wasserstoffperoxid entstehen. Letzteres wird von weiteren Enzymen wie Peroxidase und Catalase zersetzt (Michiels et al. 1994). SOD katalysiert die Reaktion:



Superoxiddismutasen sind Metalloenzyme, die entweder Kupfer und Zink (Cu,Zn-SOD), Eisen (Fe-SOD), Mangan (Mn-SOD) oder Nickel (Ni-SOD) im aktiven Zentrum enthalten und in der Regel als Homodimere, gelegentlich als Homotetramere oder noch seltener als Monomere (Fe-SOD, Mn-SOD, Ni-SOD) vorliegen.

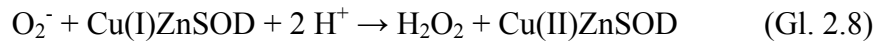
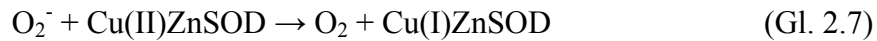
Mittlerweile wurden SODs in beinahe allen Sauerstoff atmenden und photosynthetischen Organismen, allen aerotoleranten Anaeroben, und selbst in einigen obligat anaerob lebenden Spezies gefunden (Fridovich 1986). SOD-defiziente Mutanten von Prokaryoten (Carlioz und Touati 1986) und Eukaryoten (Vanloon et al. 1986) sind in Gegenwart von Sauerstoff nicht lebensfähig. In mehreren mit Superoxid assoziierten Erkrankungen wurde eine Veränderung der Funktion oder Aktivität der SOD als direkter Verursacher ausgemacht (Kim et al. 1998; Oberley und Buettner 1979).

Die Cu,Zn-SOD findet man im Cytosol von Eukaryoten, in Chloroplasten sowie in einigen Prokaryoten; Fe-SOD wurden in Prokaryoten, Algen und den Chloroplasten einiger höherer Pflanzen nachgewiesen. In Mitochondrien sowie in einigen Prokaryoten ist Mn-SOD lokalisiert, während Ni-SOD bislang nur in Bakterien des Genus *Streptomyces* identifiziert wurden (Choudhury et al. 1999; Fink und Scandalios 2002).

Wie für Abwehrenzyme notwendig, hat SOD eine hohe Aktivität (5000-20.000 U/mg) und zersetzen die für die Zelle gefährlichen Radikalmoleküle schnell. Die Geschwindigkeitskonstante für die von Cu,Zn-SOD katalysierte Dismutation von Superoxidradikalen liegt bei etwa  $2\text{-}4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Bertini et al. 1998). Zwischen pH 5 und pH 10 ist keine Änderung der spezifischen Aktivität zu erkennen (Ellerby et al. 1996). Nennenswert ist die erstaunliche Spezifität gegenüber Superoxid: Als einziges bislang untersuchtes Enzym zeigt SOD keine einzige Nebenreaktion, sondern ist absolut spezifisch für Superoxidradikale (Bertini et al. 1998).

Kristallstruktur (Cramaro et al. 2001) und Mechanismus (Klug et al. 1972; Lavelle et al. 1977; Rotilio et al. 1972) der Cu,Zn-SOD wurden eingehend untersucht (Banci et al. 1991). Die dreidimensionale Struktur des Enzyms wurde mittels Röntgenkristallographie und NMR detailliert für den Wildtyp verschiedener Organismen (Edwards et al. 1998; Joshi und Dennis 1993; Lah et al. 1995) sowie eine Vielzahl an rekombinanten (Banci et al. 1999) und mutierten (Banci et al. 1990) Proteinen aufgeklärt.

Im Verlauf der Katalyse finden alternierend Oxidation und Reduktion des Metallions statt (Hart et al. 1999).



Die humane Cu,Zn-SOD besteht aus 153 Aminosäuren. Jede Untereinheit des dimeren Enzyms besteht aus 8  $\beta$ -Faltblättern, die in einem *greek-key*-Motiv in 2 Gruppen aus je 4 Faltblättern antiparallel angeordnet sind (Boissinot et al. 1997). Diese Struktur tritt unter anderem in Immunoglobulinen, viralen Capsidproteinen und Serinproteasen auf und trägt bei Proteinen wie SOD oder einigen Linsenkrystallinen (Jaenicke und Slingsby 2001) zu deren hoher Stabilität bei.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von Cu,Zn-SODs aus verschiedenen Organismen zeigt 23 hochkonservierte Aminosäuren, die am aktiven Zentrum, in Teilen des *greek-key*-Motivs und in der Dimerisierungsregion lokalisiert sind.

In dieser Arbeit findet das Protein M2E133QSOD Verwendung. Das Enzym M2E133QSOD wurde in Florenz von der Arbeitsgruppe Prof. Ivano Bertini entwickelt und ausführlich in Bezug auf Struktur, Aktivität und Reaktionsmechanismus charakterisiert (Bertini et al. 1998). Die dreidimensionale Struktur des Enzyms wurde durch NMR-Studien aufgeklärt und in der pdb-Datenbank unter der Kennung 1DSW veröffentlicht.

M2E133QSOD ist eine gentechnisch erstellte Mutante der dimeren humanen Cu,Zn-SOD, bei der durch Austausch zweier Aminosäuren (Phenylalanin 50 und Glycin 51 nach Glutaminsäure) die Dimerisierungsregion nicht funktionsunfähig ist. Somit kann M2E133QSOD als monomeres Protein stabil exprimiert und isoliert werden.

Allerdings senken die Mutationen der Dimerisierungsregion die Aktivität der monomeren SOD auf etwa 15%, verglichen mit dem Wildtyp. Dies wird durch eine leichte Veränderung der Sekundärstruktur auf Grund der Mutationen erklärt. Um den Aktivitätsverlust partiell zu kompensieren, enthält M2E133QSOD eine weitere Mutation (Glutaminsäure 133 nach Glutamin). Das führt zu einer Erhöhung der Aktivität um einen Faktor von 2-3, weil die negative Ladung der Glutaminsäure im Substratbindungskanal,

die das negative Radikal abstoßen kann, neutralisiert wird (Getzoff et al. 1992). Da SOD im Vergleich zu vielen anderen Enzymen eine sehr hohe Aktivität besitzt, ist der dennoch verbleibende Aktivitätsverlust im Vergleich zum Wildtyp kein Hindernis für eine sensorische Anwendung.

Diese Enzymform kann rekombinant in *E. coli*-Kulturen in ausreichend großer Menge mit geringem Aufwand exprimiert und aufgereinigt werden und zeigt über mehrere Monate bei Lagerung unter 0°C keinen nennenswerten Aktivitätsverlust (Bertini et al. 1998).

### **2.5.2.2 Elektrochemische Untersuchungen**

Die Elektrochemie der SOD wurde zunächst in Lösung (Azab et al. 1992; Lawrence und Sawyer 1979), später auch am immobilisierten Protein studiert. Auch hier wurden die aussagekräftigsten Ergebnisse durch Adsorption an einem auf einer Goldoberfläche chemisorbierten Thiol-Promotor erzielt. Insbesondere die Aminosäure Cystein konnte für Untersuchungen des Proteins in Lösung (Meng et al. 2001; Tian et al. 2002b) und zur Immobilisierung der SOD (Ohsaka et al. 2002) als Promotor genutzt werden.

Für SOD aus Rinder-Erythrozyten auf Cystein-modifizierten Goldelektroden wurden formale Potentiale von +107 mV (Meng et al. 2001), + 65 mV (Tian et al. 2002a; Tian et al. 2002b), sowie + 47 mV auf einer Mercaptopropionsäure-modifizierten Elektrode (Ge et al. 2003) berichtet.

Das formale Potential des Wildtyps der humanen Cu,Zn-SOD wurde in Gegenwart des Promotors 1,2-bis(4-pyridyl)ethen an Goldelektroden auf +72 mV bei pH 7,4 bestimmt. Alle Potentiale beziehen sich auf die Ag/AgCl/ 1M KCl-Referenzelektrode.

Die Beladung der Oberfläche mit elektrodenaktivem Protein betrug für diese Systeme etwa 12-15 pmol cm<sup>-2</sup>. Dabei wurden  $k_s$ -Werte von 1,2 s<sup>-1</sup> (Tian et al. 2002b) bis zu 65 s<sup>-1</sup> (Ge et al. 2003) festgestellt.

## **2.6 Methoden der Superoxiddetektion**

Verschiedene Methoden finden bei der quantitativen Bestimmung von Superoxidradikalen Anwendung. Die hohe Reaktivität des Radikals und seine kurze Lebenszeit stellen die entscheidenden Hürden für einen direkten Nachweis dar. Spektrophotometrische

Messungen der Reaktion des Radikals mit Farbstoffen (Fink et al. 2004) wie Tetrazolium (Frahry und Schopfer 2001; Ukeda et al. 2002) oder auch mit Proteinen wie Cyt.c (Quick et al. 2000; Sanders et al. 1994) sowie Chemilumineszenz (Barbacanne et al. 2000; Daiber et al. 2004; Sohn et al. 1999) sind nur als indirekte Assays erfolgreich und dementsprechend für *in vivo*-Messungen ungeeignet. Gleiches gilt für die direkte photometrische Bestimmung bei 250 nm (Marklund 1976) und die technisch sehr aufwendige Elektronenspin-Resonanzspektroskopie (Chen et al. 2004; Inanami et al. 2001).

Ein anderer Ansatz quantifiziert die durch Radikale hervorgerufenen Schäden an Biomolekülen wie DNA (Salles et al. 1999) oder Lipidstrukturen (Kalka et al. 2000), wobei ein Summenparameter ermittelt wird, der weder zeitlich aufgelöst noch spezifisch auf eine oxidative Spezies zurückgeführt werden kann.

In den letzten Jahren wurden Biosensoren mit immobilisiertem Cyt.c etabliert (Cooper et al. 1993; Lisdat et al. 1999), die trotz geringem technischen Aufwand Superoxid empfindlich und zeitaufgelöst quantifizieren können. Eine derartige Sensorelektrode wurde bereits im Tierexperiment angewendet (Scheller et al. 1999).

Dieser bioelektrochemische Sensor beruht auf einer Cyt.c-Elektrode, bei der das Protein auf einer mit Mercaptoundecansäure/Mercaptoundecanol modifizierten Goldelektrode kovalent immobilisiert wurde (Ge und Lisdat 2002). Die Signalkette verläuft dabei folgendermaßen: Das Superoxidradikal überträgt sein freies Elektron auf das Eisen im Hämzentrum des Proteins. Durch eine passend angelegte Spannung an der Elektrode wird das Protein reoxidiert. Dabei fließt ein katalytischer Strom, der direkt proportional zur Superoxidkonzentration ist. Änderungen der Radikalkonzentration bewirken zeitgleich eine entsprechende Änderung des Stromsignals, so dass dieser Vorgang in Echtzeit verfolgt werden kann. Das erhaltene Signal kann anschließend in die realen Radikalkonzentrationen umgerechnet werden. Dieses System erlaubt die Quantifizierung von Superoxidradikalen im Tierversuch (Buttemeyer et al. 2002; Buttemeyer et al. 2003) ebenso wie die Charakterisierung der Effektivität von Antioxidantien im *in vitro*-Ansatz (Beissenhirtz et al. 2003; Beissenhirtz et al. 2004; Ignatov et al. 2002), da die bekannte Konzentration an Antioxidans im Messsystem direkt mit der Signaländerung durch das Wegfangen der Radikale korreliert werden kann.

Die dichte Promotorschicht der langkettigen Alkanthiole verhindert dabei weitgehend eine Umsetzung von potentiell redoxaktiven Substanzen, wie Wasserstoffperoxid oder den Antioxidantien selbst. Allerdings limitiert die Menge an immobilisiertem Cyt.c die Empfindlichkeit des Sensorsystems (Ge und Lisdat 2002), so dass neue Ansätze zu finden waren, die dieses Problem lösen könnten.

Auf Grund der hohen Spezifität des Enzyms für Superoxid wurden auch SOD-Elektroden zur Superoxiddetektion eingesetzt.

In einer Messstrategie wurde dabei der Umstand genutzt, dass SOD das Radikal zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid zersetzt. Die Konzentration dieser Reaktionsprodukte steigt also in Gegenwart von SOD und Superoxid kontinuierlich an und lässt sich so durch die direkte Reaktion an einer entsprechend polarisierten Metallelektrode als Superoxidnachweis (Campanella et al. 2001) nutzen.

So berichten Scheeline und Lvovich von einem Messsystem mit zwei parallel genutzten Glaskarbonelektroden (Lvovich und Scheeline 1997), welche beide mit Peroxidase in einer Polypyrrol-Schicht modifiziert sind. Eine der beiden Arbeitselektroden verfügt zusätzlich über eine Schicht mit SOD. Beide Elektroden quantifizieren direkt die in der Messzelle vorhandene Wasserstoffperoxid-Konzentration. Die Differenz beider Elektroden beruht auf dem von der SOD zusätzlich produzierten Wasserstoffperoxid und kann so als Maß der Superoxidkonzentration genutzt werden. Ein ähnliches System beschrieben Mesaros und Mitarbeiter (Mesaros et al. 1998a; Mesaros et al. 1998b). SOD wurde in einer Polypyrrol-Schicht auf einer Platinelektrode immobilisiert. Das durch die SOD-Aktivität entstehende Wasserstoffperoxid wurde hier direkt an der Platinelektrode oxidiert und als Sensorsignal ausgewertet.

Song und Mitarbeiter immobilisierten SOD in einem Gelatine-Gel, welches mit einer Teflonmembran bedeckt und auf eine Platinelektrode aufgebracht wurde (Song et al. 1995). Die sensorische Anwendung dieses Systems beruht darauf, dass die Teflonmembran für Superoxid sehr gut, für  $H_2O_2$  jedoch nur mäßig durchlässig ist. Das an der Platinoberfläche umgesetzte  $H_2O_2$  entstammte größtenteils der SOD-katalysierten Dismutation des Superoxidradikals und nur geringfügig der Lösung.

Eine zentrale Schwäche dieser Sensoren ist die Interferenz von  $H_2O_2$ . Dieses Molekül tritt sowohl bei *in vivo*- als auch bei *in vitro*-Studien zum Superoxidradikal auch unabhängig von diesem auf. Da derartige SOD-Elektroden auf der Quantifizierung von  $H_2O_2$  beruhen,

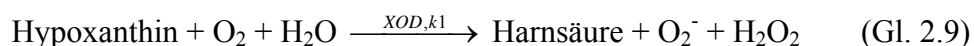


limitiert diese externe  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration die Spezifität der Sensoren und kann das Sensorsignal verfälschen.

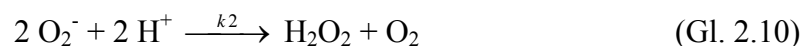
SOD-Elektroden der dritten Generation hingegen nutzen den direkten Elektronentransfer zwischen dem Enzym und einer promotor-modifizierten Goldelektrode (Di et al. 2004; Tian et al. 2002a). Hierbei kann theoretisch die Oxidation oder die Reduktion des Enzyms durch das Radikal verwendet werden, so dass zwei Potentialbereiche für die Sensorik zur Verfügung stehen. Die Verwendung von langkettigen Promotoren unterbricht allerdings den elektrochemischen Kontakt zwischen Enzym und Elektrode, so dass nur kürzere Verbindungen, wie Cystein (Tian et al. 2002b) oder Mercaptopropionsäure (Ge et al. 2003) Verwendung fanden. Diese bilden aber keine dichten Filme auf der Goldoberfläche, so dass die Diffusion redoxaktiver Substanzen aus der Probe zur Goldoberfläche und deren dortiger Umsatz nicht verhindert werden. Diese nicht vollständige Bedeckung der Oberfläche limitiert vermutlich auch die Menge an gebundenem Enzym.

## 2.7 Superoxidgenerierung *in vitro*

Zur Untersuchung der Interaktion des Superoxidradikals mit Antioxidantien und zur Kalibration von Superoxidsensoren ist es vonnöten, Superoxid in bekannter Konzentration *in vitro* erzeugen zu können. Dabei hat sich das Xanthinoxidase-System bewährt. Das Enzym Xanthinoxidase (EC 1.1.3.22) oxidiert Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure, wobei als Nebenprodukte Superoxid und Wasserstoffperoxid freigesetzt werden.



Gleichzeitig erfolgt die spontane Dismutation des Radikals.



Innerhalb einiger Sekunden wird ein *steady-state*-Zustand erreicht, bei welchem beide Reaktionen mit der gleichen Geschwindigkeit ablaufen und somit sich somit die Konzentration des Radikals nicht ändert (Fridovich und McCord 1970).

Nach Fridovich lässt sich diese stationäre Superoxidkonzentration anhand der Gleichung

$$[O_2^-] = \sqrt{\frac{k_1}{2k_2}} [XOD] \quad (\text{Gl. 2.11})$$

aus der eingesetzten Xanthinoxidase-Konzentration und den Geschwindigkeitskonstanten der Radikalbildung ( $k_1$ ) und der spontanen Dismutation ( $k_2$ ) direkt berechnen (Fridovich 1970, McCord und Fridovich 1968).

Dieser Zusammenhang kann zur Sensorkalibration verwendet werden (Ge und Lisdat 2002). Eine andere Kalibrationsmöglichkeit bietet die von der XOD-Aktivität abhängige Initialgeschwindigkeit der Radikalbildungsreaktion vor Erreichen des *steady-state* Zustandes. McNeil und Mitarbeiter nutzten dies zur Umrechnung des Sensorsignals in die vorliegende Radikalkonzentration (Tammeveski et al. 1998).

## 2.8 Multischichtaufbau nach dem *Layer-by-layer-Prinzip*

Das *Layer-by-layer*-Verfahren bietet gute Möglichkeiten zum Aufbau von sehr dünnen organischen Schichten mit definierten Parametern. Hierbei wird die elektrostatische Attraktion entgegengesetzt geladener Polyionen ausgenutzt. Abwechselnde Inkubation eines geladenen Trägers in Lösungen der Polyionen bewirkt eine Adsorption alternierender Schichten, was jeweils zu einer Umkehr der Außenladung der Oberfläche führt (Lvov et al. 1993). Abb. 2.3 zeigt die Vorgehensweise bei der Beschichtung einer negativ geladenen Trägeroberfläche und die dabei auftretenden Umkehrung der Aussenladung des Systems schematisch.

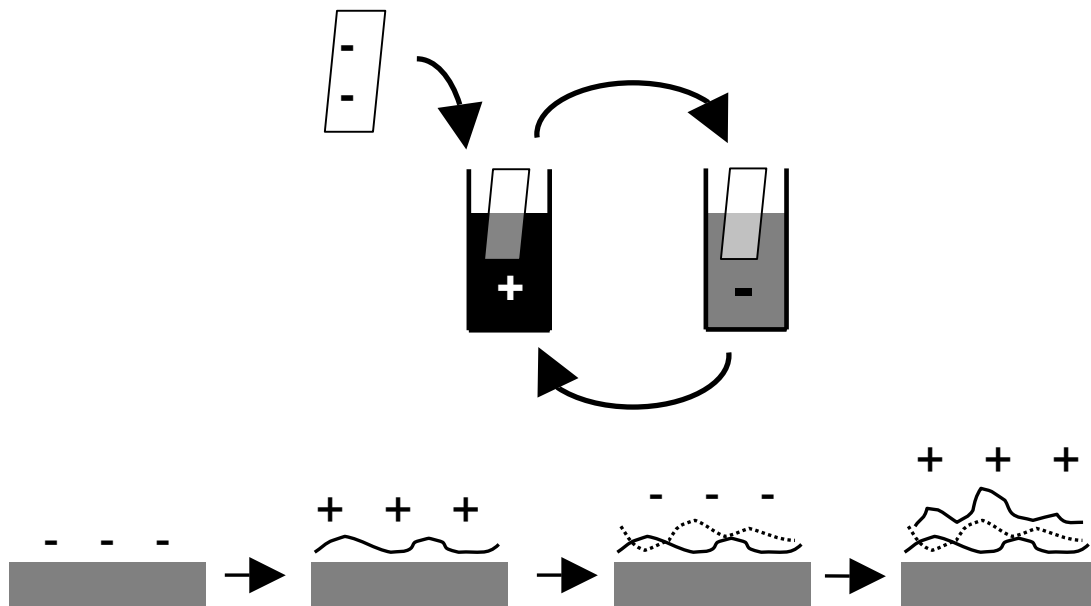


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des *Layer-by-layer*-Verfahrens zum Aufbau von Multischichten auf einer geladenen Oberfläche. Spülschritte wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Durch die Wahl geeigneter Polyionen und Reaktionsbedingungen können so strukturierte Multischichtfilme entstehen, die eine hohe Stabilität gegenüber Wasser und Puffermedien besitzen.

In den achtziger Jahren wurde von einem Schichtaufbau aus Zirkonium-Ionen und Diphosphorsäure berichtet (Lee et al. 1988). Anfang der neunziger Jahre demonstrierte Decher die erfolgreiche Bildung von Multischichten aus linearen Polyelektrolyten entgegengesetzter Ladung (Decher und Hong 1991).

Dieses Verfahren wurde seither zum Aufbau von Schichten und Kapseln auf vielerlei Trägermaterial genutzt. Neben dem Aufbau solcher Polyelektrolytschichten auf planaren Gold- oder Silikonträgern konnten auch Biomoleküle in derartigen Multischichtkapseln eingeschlossen werden (Trau und Renneberg 2003), was etwa die Stabilität von Enzymen im Waschmittel erhöht. Sogar die Verkapselung eines kompletten Viruspartikels wurde beschrieben (Lvov et al. 1994). Große Vorteile dieser Methodik sind der selbstassemblierende Aufbau, die einfache Strukturierung der Schichten durch Wahl der Inkubationsparameter wie pH-Wert oder Ionenstärke und die Möglichkeit, entsprechend erstellte Schichten oder Kapseln selektiv zu öffnen, beispielsweise durch eine Änderung des pH-Wertes. Auch die Durchlässigkeit der Schichten für kleine Moleküle kann

kontrolliert verändert werden, so dass ein Einsatz in der *drug-delivery* Erfolg versprechend ist.

Häufig verwendete Polyelektrolyte sind Poly(styrensulfonsäure) (PSS), Poly(allylaminhydrochlorid) (PAH), Poly(ethylenimin) (PEI) und Polyacrylsäure (PAA). Seltener findet die in dieser Arbeit eingesetzte Poly(anilinsulfonsäure) (PASA), Gebrauch (s. Abb. 2.4).

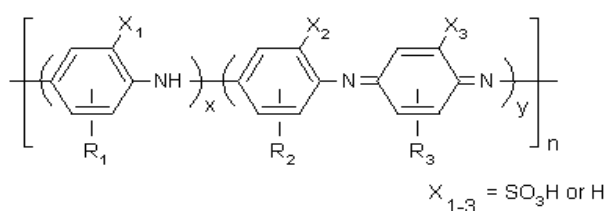


Abb. 2.4: Struktur des Polyelektrolyten PASA

Der Einbau von Biomolekülen wie etwa Proteinen kann auf dreierlei Wegen erfolgen: Zum einen kann ein Makromolekül in Lösung durch Zugabe entgegengesetzt geladener Polyelektrolyte überzogen und darauf durch alternierende Inkubation mit einem zweiten Polyelektrolyt eine entsprechende Kapsel (Caruso et al. 2000; Rilling et al. 1997) gebildet werden. Zum anderen können Biomoleküle in bereits gebildete, durchlässige Schichtsysteme eindiffundieren (Gole et al. 2001; McKenzie und Marken 2003). Schließlich können auch Proteine oder DNA-Moleküle für den Schichtaufbau selbst verwendet werden, da sie auf Grund der geladenen Aminosäuregruppen ebenfalls eine Nettoladung besitzen. So kann in Abb. 2.3 ein Polyelektrolyt durch ein entsprechend geladenes Protein ersetzt werden (Brynda und Houska 1998). Mit diesem Verfahren erhält man also Multischichten mit integrierten Biokomponenten, die bei geeigneter Vorgehensweise ihre katalytische oder elektrochemische Aktivität behalten. Somit lässt sich bei gleich bleibender Trägeroberfläche ein Vielfaches an Proteinmenge immobilisieren. Durch die Wahl der Schichtanzahl und der Depositionsbedingungen kann die immobilisierte Menge während des Schichtaufbaus kontrolliert werden.

Dies wurde in der Vergangenheit für einige Proteine gezeigt. Zu nennen sind insbesondere Lysozym (Kayushina et al. 1996; Lojou und Bianco 2004), Myoglobin (Ma et al. 2000; Panchagnula et al. 2002), Hämoglobin (He et al. 2002; Wang und Hu 2001),

Glucoseoxidase (Chaniotakis 2004; Hodak et al. 1997), Peroxidase (Caruso und Schuler 2000; Li et al. 2001) und einige Antikörper (Caruso et al. 1997).

Allerdings beruhen viele dieser Arbeiten zumeist auf der Bestimmung der Massezunahme bei der Aufbringung mehrerer Schichten. Bei bioelektrochemischen Systemen mit den Proteinen Hämoglobin (He et al. 2002; Wang und Hu 2001), Myoglobin (Ma et al. 2000) und Cytochrom P450cam (Lvov et al. 1998) konnte eine Signalzunahme nur für zwei bis sechs Schichten erzielt werden, die dann eine Sättigung zeigten. Bei der Immobilisierung einer höheren Zahl an Schichten wurde zwar eine weitere Zunahme an Protein durch massebezogene Nachweissysteme wie Quarzkristallmikrowaagen gezeigt. Ein elektrochemischer Kontakt zwischen Elektrode und diesen äußeren Proteinschichten konnte aber nicht erreicht werden (Ma et al. 2000; Wang und Hu 2001), so dass die Elektrochemie dieser Systeme durch die Distanz zwischen Protein und Elektrodenoberfläche limitiert ist.

Die Anwendung solcher Proteinmultischichten in der Biosensorik wurde kürzlich in einem Review vorgestellt (Campas und O'Sullivan 2003). Multischicht-Biosensoren auf elektrochemischer Basis unter Verwendung von Glukoseoxidase oder Peroxidase beruhen allerdings meist auf der Diffusion eines elektroaktiven Produktes der Enzymreaktion (Mu und Xue 1996) oder eines externen Mediators (Li et al. 2001; Zhang et al. 2004) zur Elektrodenoberfläche, nicht auf direktem Elektronentransfer zwischen Protein und Elektrode. Ein derartiges Vorgehen beinhaltet die Gefahr, dass bei der Vermessung komplexer, etwa biologischer Proben die tatsächlich nachgewiesene Substanz entweder unabhängig vom Substrat des Enzyms vorliegt oder mit anderen Bestandteilen der Probe weiterreagiert, so dass eine Korrelation des Sensorsignals mit der Konzentration des Analyten erschwert wird. Des Weiteren ist die notwendige Diffusion des Mediators zwischen Analyt und Sensor ein limitierender Faktor. Für *in vivo*-Untersuchungen sind beide Ansätze aus dem gleichen Grund nicht verwendbar. Hier kann zusätzlich das Enzymsystem oder die Stoffwechselprodukte des untersuchten Organismus die Konzentration des Reaktionsprodukts beeinflussen.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Chemikalien**

Cytochrom c aus dem Pferdeherz (Cyt.c), Superoxiddismutase aus den Rinder-Erythrocyten (SOD, E.C. 1.15.1.1), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)Carbodiimid (EDC), HEPES und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) wurden von Sigma (Steinheim, Deutschland) bezogen. 11-Mercaptoundecansäure(MUA), 11-Mercapto-Undecanol (MU), Poly(anilinsulfonsäure) (PASA), sowie Poly(styren-sulfonsäure) (PSS) wurden bei Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) gekauft. Harnsäure, Harnsäure, Silbersulfat und Ascorbinsäure stellte VWR (Bad Nauheim, Deutschland). Xanthinoxidase aus Kuhmilch (XOD, E.C. 1.1.3.22, 20 U/1,09 ml) wurde von Roche(Mannheim, Deutschland) geliefert.

Golddraht (>99% Reinheit, Durchmesser 0,5 mm) wurde von Goodfellow (Cambridge, Großbritannien) bezogen.

##### **3.1.2 Geräte**

Alle zykelvoltammetrischen Untersuchungen wurden an einem Autolab System (Metrohm, Deutschland) durchgeführt. Amperometrische Messungen wurden an einem Model 720A Potentiostaten von CHI Instruments (Austin, USA) vorgenommen.

Für Oberflächenplasmonresonanz-Experimente diente ein Biacore 2000 (Biacore AB, Uppsala, Schweden). Impedanzspektroskopische Messungen wurden an einem SI 1260 von Solartron Analytical (Farnborough, Großbritannien) durchgeführt.

Für alle elektrochemischen Untersuchungen wurden eine 1-ml-Messzelle mit einer Ag/AgCl/1 M KCl-Referenzelektrode von Biometra (Göttingen, Deutschland) und einer Platindraht-Gegenelektrode verwendet. Wenn nicht explizit anders angegeben, beziehen sich alle in dieser Arbeit angegebenen Potentiale auf dieses System.

### **3.1.3 Puffer**

Phosphatpuffer wurden aus Kaliumdihydrogenphosphat und Dikaliumhydrogenphosphat erstellt und mit Kaliumhydroxid oder Phosphorsäure auf den gewünschten pH-Wert eingestellt.

HEPES-Puffer wurde mit Kaliumhydroxid und Salzsäure auf den einzustellenden pH-Wert versetzt.

Für die Arbeit an den Multischichtelektroden wurden drei Phosphatpuffer verwendet:

Puffer 1: 5 mM Phosphat pH 7 zur Aufbringung der Cyt.c-Monoschicht sowie als Puffer für die zykl voltammetrischen Untersuchungen des Systems. Für die Bestimmung der elektrochemischen Eigenschaften des Multischichtsystems in einer pH-Variation von 5 bis 9 wurde dieser Puffer mit Phosphorsäure oder Kaliumhydroxid auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt.

Puffer 2: 0,5 mM Phosphatpuffer pH 5 für die Herstellung der PASA- und Cyt.c-Lösungen für die Aufbringung der alternierenden Schichten.

Puffer 3: 5 mM Phosphatpuffer pH 7,5 als Puffer für die amperometrischen Superoxidmessungen mit der fertig gestellten Multischichtelektrode.

Zur Arbeit an den SOD-Mutanten wurde 50 mM HEPES-Puffer pH 7,5 (Puffer 4) genutzt. Auch hier wurde eine pH-Reihe von 5 bis 9 durch Einstellung mit Salzsäure erstellt.

Zur Herstellung der Puffer wurde hochreines Wasser (>18 M $\Omega$  Widerstand) aus einer MilliQ Synthesis (Millipore, Schwalbach, Deutschland) verwendet.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Elektrodenpräparation**

#### **3.2.1.1 Herstellung der Cyt.c-Monoschichtelektroden**

Die Monoschichtelektroden wurden nach einem etablierten Protokoll (Ge und Lisdat 2002) hergestellt. Golddrahtelektroden wurden für 4 h in 2M Kaliumhydroxid gekocht und anschließend 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Nach ausführlichem Abspülen mit Millipore-Wasser wurden sie zunächst über Nacht in 90%-iger Schwefelsäure und nach einem weiteren Abspülschritt für mindestens 15 Minuten in 65%-iger Salpetersäure

gelagert. Danach wurde erneut mit Wasser gespült und die Elektroden dann über 2 Nächte in einer 1:3-Mischung aus 5 mM MUA und MU (jeweils in Ethanol) inkubiert. Nach Spülung mit Ethanol und Wasser wurden die modifizierten Elektroden für 2 Stunden in eine 20  $\mu$ M Lösung Cyt.c in Puffer 1 getaucht und abschließend ausgiebig mit Puffer 1 gespült.

Wenn explizit angegeben, wurde zur kovalenten Fixierung des Cyt.c 2.5 mM EDC für 30 Minuten zur Lösung hinzugefügt.

Monoschichtelektroden mit Apo-Cyt.c anstelle von Cyt.c wurden nach gleicher Vorgehensweise unter Verwendung einer Apo-Cyt.c-Lösung erstellt.

### **3.2.1.2 Aufbau der Cyt.c-PASA-Multischichtelektroden**

Frisch präparierte Cyt.c-Monoschichtelektroden wurden sukzessive in PASA- (0,2 mg/ml in Puffer 2) und in Cyt.c-Lösung (20  $\mu$ M in Puffer 2) für jeweils 10 Minuten getaucht. Nach jedem Schritt erfolgten 5 Waschschriffe in Puffer 2. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die gewünschte Anzahl an Schichten erreicht war. Diese Inkubationsvorgänge wurden von einem Roboter der Firma Fischertechnik (Waldachtal, Deutschland) aus dem Baukasten „Industry Robots“ durchgeführt und per Software gesteuert und kontrolliert.

Zur genaueren Untersuchung des Elektronentransfermechanismus wurden Multischichten mit Apo-Cyt.c aufgebaut. Hierzu wurde, wo angegeben, anstelle der Cyt.c-Lösung eine Apo-Cyt.c-Lösung gleicher Konzentration in den jeweils angegebenen Aufbauzyklen verwendet. Bei der Betrachtung gemischter Schichten aus Cyt.c und Apo-Cyt.c wurde eine Lösung mit Cyt.c und Apo-Cyt.c entsprechend der angegebenen Konzentrationsverhältnisse erstellt. Die Gesamtproteinkonzentration, d.h. die Summe der Konzentrationen von Cyt.c und Apo-Cyt.c, betrug auch hier stets 20  $\mu$ M.

### **3.2.1.3 Herstellung der SOD-Elektroden**

Frisch gereinigte Golddrahtelektroden wurden über Nacht in einer 50-300  $\mu$ M SOD-Lösung in Puffer 4 über Nacht inkubiert und anschließend mehrfach mit Puffer gespült.



Für Kontrollexperimente mit Wildtyp-SOD und einer Mutante an promotor-modifizierten Goldelektroden wurden zunächst gereinigte Golddrahtelektroden für 6h in 10 mM Mercaptopropionsäure (MPA) und anschließend über Nacht in einer 100  $\mu$ M Proteinlösung (Wildtyp bzw. Mutante) in Puffer 4 inkubiert.

### **3.2.2 Molekularbiologische und Proteinchemische Methoden**

Die molekularbiologischen Methoden sowie die Expression und Reinigung der SOD-Mutanten wurden nach dem bereits etablierten Protokoll zur Arbeit an der humanen Cu,Zn-SOD durchgeführt (Getzoff et al. 1992).

Soweit kein Hersteller angegeben ist, wurden Chemikalien und Geräte der Universität Florenz, Italien, benutzt.

#### **3.2.2.1 Bakterienkultivierung**

Bakterienkulturen von *Escherichia coli* (E. coli) wurden in folgendem Medium angesetzt: 16 g Trypton, 10 g Hefe-Aufschluss und 5 g NaCl wurden mit Wasser auf 1 l Volumen aufgefüllt (2XYT-Flüssigmedium). Zum Ausplattieren der Bakterienkulturen wurde dem gleichen Medium 20 g/l Agar hinzugefügt (2XYT-Plattenmedium). Bei Bedarf wurde Ampicillin zu einer Endkonzentration von 200  $\mu$ g/ml hinzugegeben (2XYTamp). Die Kultivierung erfolgte bei 37°C.

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurden E. coli-Bakterien des Stammes DH5 $\alpha$  genutzt, für die Proteinexpression solche des Stammes TOPP1 (beide Invitrogen, San Giuliano, Italien). Alle Medien und die dabei verwendeten Gefäße wurden in einer Autoklavieranlage sterilisiert.

#### **3.2.2.2 Plasmide**

Als Ausgangspunkt der molekularbiologischen Arbeit stellte Frau Dr. Maria Silvia Viezzoli von der Universität Florenz, Italien, freundlicherweise ein Plasmid zur Verfügung, auf dem sich das Gen pM2E133QSOD sowie ein  $\beta$ -Lactamase-Gen, welches eine Ampicillin-Resistenz vermittelt, befanden. Ersteres kodiert eine humane Cu,Zn-SOD,

welche durch Austausch zweier Aminosäuren im natürlichen Dimerisierungsbereich nach der Expression als Monomer stabil und aktiv vorliegt. Am N-Terminus befindet sich eine Leader-Sequenz der Cu,Zn-SOD des *Photobakterium leiognathii*, die einen Transport des exprimierten Proteins in den periplasmatischen Raum bewirkt. Der Vektor ist eine Variante von pBR322.

Das SOD-Gen ist durch Kopplung mit dem Promoter des lac/UV5tac-Gens aus dem Bakteriophagen T7 durch das Lactoseanalogon IPTG induzierbar.

### **3.2.2.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA (Mini-Prep und Midi-Prep)**

Zur Sequenzierung der Plasmide und zur Transformation der Bakterien wurde Plasmid-DNA isoliert und aufgereinigt. Verwendet wurden je nach Mengenbedarf die Produkte Qiagen Plasmid Midi und Qiagen Plasmid Mini von Qiagen (Mailand, Italien) nach Herstellerangaben. Bakterien, welche das zu untersuchende Plasmid enthielten, wurden in 2 ml 2XYTamp 8h lang bei 37°C inkubiert. Für ein Midi-Prep wurden dann 200µl dieser Lösung zu 100 ml 2XYTamp gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde spektroskopisch bei 260 und 280 nm Wellenlänge bestimmt und die Proben anschließend bei -20°C gelagert.

Die Sequenzierung der gereinigten DNA zur Kontrolle der erfolgten Mutationsschritte wurde bei der Firma PRIMM S.r.l. (Mailand, Italien) in Auftrag gegeben.

### **3.2.2.4 Ortsgerichtete Mutagenese**

Das QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene (La Jolla, USA) bietet eine einfache Vorgehensweise zur Gewinnung von Plasmid-DNA, auf der im Vergleich zum Wildtyp ein bis drei Codons gezielt verändert werden können. Durch Erstellung von PCR-Primern, die im zu mutierenden Bereich der Ausgangs-DNA binden und selbst das veränderte Codon enthalten, kann durch eine PCR-Reaktion ausreichend Plasmid-DNA mit dem gewünschten mutierten Gen erhalten werden.

Mittels dieses Kits wurden unter strenger Befolgung der Herstellervorgaben im Wt-Gen die Codons verschiedener ausgewählter Aminosäuren gegen ein Codon für Cystein ausgetauscht. In drei Fällen wurde eine Aminosäure ausgetauscht. Durch den erneuten

Einsatz des Kits, diesmal auf Basis der gewonnenen Einzelmutanten-Plasmide, wurden drei Plasmide mit dem Gen von SOD-Doppelmutanten erhalten. Die benötigten Primer wurden anhand der interaktiven Website von Stratagene (<http://labtools.stratagene.com/QC>) entworfen und bestellt.

Tabelle 3.1 listet die verwendeten Primer auf.

D11Cfor	CAGTATGTGTTTTGAAGGGT <b>TGT</b> GGGCCC GTTCAAGGTATTATTAAC
A60Cfor	CGGCCGGCTGTACCAGT <b>TGT</b> GGTCCTCACTTTAATCCTC
G61Cfor	CCGGCTGTACCAGTGCA <b>TGT</b> CCTCACTTTAATCCTC
S68Cfor	GTCCTCACTTTAATCCTCTCT <b>TGT</b> AGAAAACACGGTGGGCCAAAG
G141Cfor	CAAAGACCCGTAACGCT <b>TGT</b> TCCCGTTTGGCTTGTG
S142Cfor	GACCGGTAACGCTGGAT <b>TGT</b> CGTTTGGCTTGTGGTG

Tabelle 3.1: Auflistung der zur Mutagenese verwendeten Primer (nur *for*-Version). Das Zielcodon der Cystein-Mutanten ist fettgedruckt und unterstrichen.

Auf die Angabe der rev-Primer wird aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Der PCR-Ansatz enthält:

- 5 µl 10-fach Reaktionspuffer *Pfu*
- 1 µl dNTP-Mix (100 mM)
- 1 µl Matrizen-DNA 100 ng/µl (pM2E133Q bzw. Plasmid der ersten Mutationsrunde)
- 1,25 µl jeweils des Vor- und Rückprimers (10pmol/µl)
- 1 µl DNA-Polymerase *Pfu Turbo* (2,5U/µl)
- aufgefüllt auf 50 µl mit sterilem Wasser

Die Parameter der PCR wurden nach Herstellerangabe wie folgt festgelegt:

Initialdenaturierung	95°C	30s
Danach 16 Zyklen aus		
Denaturierung	95°C	30s
Anlagerung	55°C	60s
Verlängerung	68°C	420s.

Nach Abschluss der Reaktion lagerte die DNA im Gerät bei 4°C.

### **3.2.2.5 Transformation der Bakterien**

Die Transformation der E.coli-Bakterien erfolgte nach folgendem Hitzeschock-Protokoll: Kompetente Zellen der E.coli-Stämme TOPP1 (zur Proteinexpression) bzw. DH5 $\alpha$  (zur Plasmidisolierung) wurden mit 100 ng Plasmid-DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock von 42°C für 90s und sofortiger Inkubation auf Eis für 2 min. Nach diesem Transformationsschritt wurden die Ansätze zum weiteren Wachsen über Nacht bei ständigem Schütteln auf 37°C temperiert.

### **3.2.2.6 Bakterienkultivierung und Induktion der Proteinexpression**

Alle verwendeten Gefäße und das Medium wurden im Autoklaven, die benutzten Lösungen durch Filtration sterilisiert.

3-4 Kolonien der transformierten Bakterien wurden zunächst in eine 50 ml-Kulturflasche mit 30 ml 2XYTamp über Nacht bei 37°C im Schüttler kultiviert. Je 5 ml dieses Inoculums wurde dann in eine von 4 2l-Flaschen mit 2l 2XYTamp überführt und bei 37°C im Schüttler inkubiert, bis eine optische Dichte von 0,6 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht war. Dies wurde als ausreichendes Wachstum der Kulturen erachtet, um mit der Induktion der SOD zu beginnen. Hierzu wurden von 500  $\mu$ l einer sterilen 1 M Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid-Lösung (IPTG) zugegeben. Nach weiteren 12-16 h Wachstums wurde den Kulturgefäßen 750  $\mu$ l einer sterilen 1 M CuSO<sub>4</sub>-Lösung zugesetzt. 1h danach wurden die Zellen durch Zentrifugation mit 7000 U/min für 10 min bei 4°C geerntet.

### **3.2.2.7 Zellaufschluss und Proteinisolierung**

Die Aufreinigung der Proteine wurde nach dem Prinzip des osmotischen Schocks durchgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C vorgenommen, um zelleigene Proteasen zu inhibieren.

Die Zugabe einer 40%-igen Saccharoselösung zu den geernteten Pellets bewirkte ein Aufplatzen der Zellmembran. Die im Periplasma befindliche SOD wurde durch mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte von den übrigen Zellfragmenten getrennt. Die Proteinpräparation wurde auf einer Sephadex-Chromatographiesäule durch Elution mit

einem Natriumchloridgradienten von 0 bis 150 mM aufgetrennt. Durch SDS-Gelchromatographie wurden die SOD-enhaltenden Fraktionen identifiziert und gesammelt. Diese wurden gegen 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 5,5 dialysiert.

Die Proteinkonzentration wurde spektroskopisch bei 265 nm bestimmt (molarer Absorptionskoeffizient von  $7400 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Ein deutlicher Überschuss an Kupfer- und Zinksulfat wurde zugesetzt, um die aktiven Zentren der SOD mit den benötigten Metallionen zu versehen. Nach einer Volumenreduktion wurden 5mM DTT hinzugefügt, um die Ausbildung intramolekularer Schwefelbrücken zu verhindern. Stammlösungen der SOD-Mutanten wurden bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert und unmittelbar vor der Anwendung zur Elektrodenmodifikation aufgetaut.

### **3.2.2.8 Herstellung von Apo-SOD**

Apo-Formen der SOD-Mutanten wurden nach dem modifizierten Protokoll von Fridovich et al (McCord und Fridovich 1969) auf zwei Arten präpariert: 1ml 100  $\mu\text{M}$  MutSOD-Lösung wurde über mindestens 6h bei Raumtemperatur mit 20 mM EDTA in Puffer 4 inkubiert und anschließend über Nacht gegen EDTA-freien Puffer 4 dialysiert, um adsorbiertes EDTA und EDTA-Cu-Komplexe zu entfernen. Alternativ wurden mit SOD-Mutanten modifizierte Elektroden in der gleichen EDTA-Lösung für mindestens 6h gelagert und anschließend ausführlich mit Puffer gespült. In beiden Fällen wurde die erfolgreiche Entfernung des Kupfers elektrochemisch durch das Fehlen der charakteristischen Redoxpeaks in Zyklovoltamogrammen verifiziert. Die Integrität des Proteins wurde nach EDTA-Behandlung durch SDS-Gelelektrophorese bestätigt.

### **3.2.2.9 Präparation von Apo-Cyt.c**

Apo-Cyt.c wurde durch chemische Entfernung der Häm-Gruppe nach dem Protokoll von Stellwagen und Rysavy (Stellwagen et al. 1972) hergestellt. 80 mg Cyt.c wurden in 10 ml Millipore-Wasser gelöst und mit 2 ml Eisessig und 15 ml 0,8%-igem Silbersulfat versetzt. Diese Mischung wurde für 4 h bei  $44^\circ\text{C}$  in Dunkelheit inkubiert und im Anschluss über Nacht gegen 0,2 M Essigsäure dialysiert. Zur Ausfällung des Apoproteins wurde ein 10-facher Volumenüberschuss an saurem Aceton (100 ml Aceton und 1 ml 5 N

Schwefelsäure) zugesetzt und das Präzipitat mittels Zentrifugation gesammelt, mehrfach mit Aceton gewaschen und in 5 ml 0,2 M Essigsäure aufgenommen. Fester Harnstoff wurde zugegeben, bis die Lösung klar erschien. Mit der Zugabe eines 25-fachen molaren Überschusses an 2-Mercaptoethanol und 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde gebundenes Silber entfernt. Schließlich wurde durch ausführliche Dialyse gegen Puffer 1 die Proteinlösung von allen niedermolekularen Resten der Präparation gereinigt und spektrometrisch die Konzentration bestimmt. Die Integrität des Proteins wurde nach erfolgter Präparation durch SDS-Page bestätigt. 1-ml-Aliquots der Apo-Cyt.c-Lösung mit einer Konzentration von 3,5 mg/ml wurden bei -20°C gelagert. Die erfolgreiche Entfernung der Häm-Gruppe wurde spektroskopisch (keine Häm-Bande bei 350-450 nm) sowie elektrochemisch (keine Peaks im Zyklovoltammogramm) nachgewiesen.

### **3.2.2.10      Aufreinigung der kommerziellen Xanthinoxidase**

Die kommerzielle XOD-Präparation wurde durch Zentrifugation (10 min bei 11.000 U/min) und anschließender Dialyse gegen Phosphatpuffer (20 mM, pH 8) gereinigt und für die amperometrischen Superoxid-Messungen von mit den SOD-Mutanten verwendet.

### **3.2.2.11      Isoelektrische Fokussierung**

Die Isoelektrische Fokussierung von PASA zur Bestimmung des Isoelektrischen Punktes wurde freundlicherweise von Herrn Doktor Lehnhardt aus der Arbeitsgruppe Biochemie der Pflanzen an der Universität Potsdam auf einer Multiphor II (Pharmacia, Uppsalla, Schweden) mit Immobiline DryStrips (Amersham Biosciences, Uppsalla, Schweden) vorgenommen.

### **3.2.3 Analytische und sensorische Methoden**

#### **3.2.3.1 Zyklische Voltammetrie**

##### **3.2.3.1.a Multischichtelektroden**

Wenn nicht anders angegeben, wurden in 5 Scans zwischen -350 und +350 mV bei einer Scanrate von 100 mV/s in Puffer 1 aufgenommen. Lage und Flächen auftretender Peaks wurde durch die Autolab-Software GPES 4.8 bestimmt. Das formale Potential wurde als Mittelpunktspotential zwischen Oxidations- und Reduktionspeak errechnet. Die heterogene Elektronentransfergeschwindigkeitskonstante  $k_s$  wurde nach der Methode von Laviron (Laviron 1978) durch Untersuchung der Zunahme in Peakseparation mit steigender Scanrate (50 mV/s bis 20 V/s) ermittelt. Dabei wurde stets die Anwendbarkeit des Modells durch Bestimmung des Faktors  $\alpha$  verifiziert.

Durch Integration der Peakströme wurde die Menge an elektroaktivem Protein auf der Elektrodenoberfläche kalkuliert.

##### **3.2.3.1.b SOD-Mutanten**

Zur Untersuchung der SOD-Elektroden wurden 5 Scans zwischen -150 und +450 mV bei 100 mV/s in Puffer 4 gemessen.  $K_s$  wurde gleichfalls durch Variation der Vorschubgeschwindigkeit zwischen 20 mV/s und 15 V/s bestimmt.

#### **3.2.3.2 Amperometrische Superoxidmessungen**

Für die Multischichtelektroden wurden 990  $\mu$ l von Puffer 3 in die Messzelle gegeben und unter konstantem Rühren ein Potential von +150 mV angelegt. Nach Einstellung eines konstanten Hintergrundstroms von wenigen nA wurde 10  $\mu$ l Hypoxanthin zu einer Endkonzentration von 100  $\mu$ M in der Zelle hinzupipettiert. Eine anschließende Zugabe von XOD (5 mU/ml bis 60 mU/ml) startete die radikalproduzierende Reaktion. Nach Erreichen eines stabilen Stromplateaus wurden einige  $\mu$ l einer SOD-Lösung (1-3 mg/ml) hinzugefügt, um Superoxid aus der Lösung zu entfernen. Alternativ wurden Aliquots (1-3  $\mu$ l) einer Ascorbatstammlösung zugesetzt.

Im Verlauf des Experiments wurde die Stromstärke in Abhängigkeit von der Zeit als Messsignal aufgezeichnet und anschliessend mit der Software Microcal Origin ausgewertet. Einen typischen Kurvenverlauf zeigt Abb. 3.1.

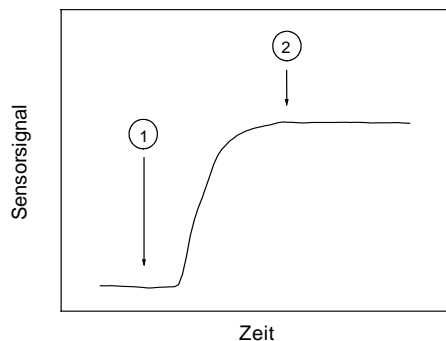


Abb. 3.1: Typischer Kurvenverlauf einer amperometrischen Superoxiddetektion.  
1: Hintergrundsignal vor Beginn der Radikalgenerierung  
2: Signalplateau in Gegenwart des Radikals

Das Sensorsignal wurde als Differenz der Stromstärke vor (Zeitpunkt 1) und nach XOD-Zugabe (Zeitpunkt 2) errechnet.

Für die SOD-Elektroden wurde ähnlich vorgegangen. Hier fand Puffer 4 Verwendung, die Potentiale wurden zwischen +350 und -220 mV variiert, und anstelle von 100  $\mu\text{M}$  Hypoxanthin wurden 50 bis 100  $\mu\text{M}$  Xanthin als Substrat genutzt

### 3.2.3.3 Impedanzspektroskopie

Mit einer SOD-Mutante und einer ApoSOD-Mutante modifizierte sowie unmodifizierte Goldelektroden wurden in Puffer 4 in Abwesenheit sowie Gegenwart von 10 mM Hexacyanoferrat (1:1 Gemisch von Ferri- und Ferro-Form) bei Frequenzen zwischen 0,5 und 50.000 Hertz bei einem konstanten Potential von +159 mV und einer Störamplitude von 10 mV vermessen.

### 3.2.3.4 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie

Ein sauberer Biacore PIONEER Sensorchip wurde für 48h in einer 1:3-Mischung aus 5mM MUA und MU in Ethanol 1:3 inkubiert, mit Millipore-Wasser gespült und in das Biacore-Fliesssystem eingesetzt. Puffer 2 (10 min), Cyt.c- und PASA-Lösungen (je 2,5 min)



wurden wie bei der Herstellung der Multischichtelektroden und mit einer Fließrate von 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  verwendet. Für die Untersuchung der SOD-Mutanten wurde ein sauberer SPR-Chip unmodifiziert in das Fließsystem eingebaut. Für 200 s wurde der Chip mit Puffer 4 gespült. Anschließend wurde eine 100  $\mu\text{M}$  Lösung einer SOD-Mutante bzw. einer Apo-SOD-Mutante für 3h über den Chip geleitet, gefolgt von erneut 15 min Puffer 4, jeweils mit einer Fließrate von 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Die Änderung des Resonanzsignals gegen die Zeit hier als Maß für die Massenlagerung auf der Chipoberfläche.

### **3.2.3.5 Spektroskopische Untersuchung der Kinetik der Radikalbildung**

Zur Errechnung der Geschwindigkeitskonstante der XOD-katalysierten Superoxidgenerierung wurde photometrisch für 1 min die Reduktion von Cyt.c (100  $\mu\text{M}$ ) in Puffer 4 durch 5-80 mU/ml XOD und 50  $\mu\text{M}$  Xanthin bei 550 nm gemessen. Mit einem molaren Adsorptionskoeffizient von  $2,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für reduziertes Cyt.c wurden die unterschiedlichen Initialgeschwindigkeiten bei den verschiedenen XOD-Aktivitäten nach dem Protokoll von Ge und Lisdat (Ge und Lisdat 2002) ausgewertet.

## **4. Ergebnisse und Diskussion**

Dieser Abschnitt der Arbeit ist in zwei Sektionen unterteilt: 4.1 beschreibt die erzielten Ergebnisse bei Aufbau und Anwendung der Multischichtelektrode, 4.2 stellt die Gewinnung und Untersuchung der SOD-Mutanten dar.

### **4.1 Multischichtelektroden aus Cytochrom c und einem Polyelektrolyten**

Ziel dieses Teils der Arbeit war, eine neuartige Multischichtarchitektur mit Cyt.c auf Elektrodenoberflächen aufzubauen und die elektrochemische Ansprechbarkeit der Proteinmoleküle in der Schichtstruktur zu charakterisieren.

Durch diesen Ansatz sollte die Oberflächenbeladung an elektroaktivem Protein auf der Elektrode gegenüber den herkömmlichen Monoschichtelektroden erhöht werden. Dies verspricht bei einer Anwendung als elektrochemischer Superoxidsensor eine deutliche Verbesserung der Empfindlichkeit gegenüber den bislang in der Literatur beschriebenen Monoschichtsensoren.

#### **4.1.1 Aufbau von Cyt.c/Polyelektrolyt-Multschichten**

Für einen Aufbau derartiger Architekturen ist die *Layer-by-layer*-Technik gut geeignet. Daher wurde auf einer Cyt.c-Monoschichtelektrode ein Netzwerk alternierender Schichten aus Cyt.c und einem entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten aufgebaut.

Zunächst war ein geeigneter Polyelektrolyt auszuwählen und der Aufbau der Multischichtarchitektur nachzuweisen und zu optimieren.

Die Elektrochemie der entstandenen Multischichten war zu untersuchen und die Menge an gebundenem Protein zu bestimmen. Besonderes Augenmerk sollte auf die Untersuchung des Elektronentransfermechanismus von den äußeren Schichten zur Elektrode gelegt werden. Schließlich war die Reaktion der Multischichtelektrode mit Superoxid zu charakterisieren und die Verwendung dieser neuen Elektroden als empfindliche Superoxidsensoren zu demonstrieren.

#### **4.1.1.a Vorversuche**

In ersten Vorversuchen wurde der Aufbau von elektroaktiven Protein-Multischichten mit Cyt.c und zwei verschiedenen Polyelektrolyten, PSS und PASA, untersucht. Eine Monoschichtelektrode wurde durch Adsorption von Cyt.c auf einer mit einem MUA/MU-Gemisch modifizierten Goldelektrode hergestellt. Eine kovalente Verknüpfung mittels Crosslinker oder Aktivierungsreagenzien erfolgte nicht. Die erfolgreiche Immobilisation der Monoschicht wurde elektrochemisch bestätigt.

Der isoelektrische Punkt von PASA wurde mittels isoelektrischer Fokussierung auf 3,7 bestimmt. Für Cyt.c wird vom Hersteller sowie in der Literatur ein isoelektrischer Punkt von 10,1 angegeben. Daher ist zwischen pH-Werten von 4,5 und 9,5 von einer entgegengesetzten Ladung beider Stoffe auszugehen, so dass durch elektrostatische Wechselwirkungen ein Aufbau von Multischichten aus beiden Substanzen möglich sein sollte.

Die Monoschichtelektroden wurden per Hand abwechselnd in Polyelektrolyt- (PASA bzw. PSS) und Cyt.c-Lösungen getaucht und zwischendurch mit Puffer gespült. Nach 2 bis 10 Inkubationsschritten in der Proteinlösung wurde ein zyklisches Voltammogramm aufgenommen. Die Peakflächen wurden mittels der geräteeigenen Software bestimmt und mit denen der Monoschichtelektroden verglichen. Dabei zeigten die unter der Verwendung von PASA hergestellten Elektroden eine stetige Zunahme der Peakflächen mit steigender Anzahl der Inkubationsschritte und somit eine Erhöhung der Elektrodenbeladung mit elektroaktivem Protein, während die Peakflächen der PSS-Elektroden im Rahmen der Messgenauigkeit denen der Monoschichtelektrode entsprachen. Aus diesem Grund wurde PASA als Polyelektrolyt für die weiteren Experimente ausgewählt.

#### **4.1.1.b Optimierung der Immobilisationsbedingungen**

Mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie wurden die Parameter des Schichtaufbaus optimiert. Ein Goldchip wurde für die Bindungsstudien mit einem Mercaptoundecansäure/Mercaptoundecanol-Gemisch modifiziert und an dieses eine Monoschicht Cyt.c adsorbiert. Danach wurden sequentiell Polyelektrolyt, Puffer und

Protein im Fließsystem über den Chip geleitet. Die dabei auftretenden Anlagerungsprozesse wurden online verfolgt und graphisch ausgewertet. Daraus konnte die resultierende Proteinkonzentration pro Anlagerungsschritt errechnet werden.

Pufferzusammensetzung und pH-Wert wurden ebenso wie die Konzentration des Polyelektrolyten variiert. Optimale Ergebnisse wurden in 0,5 mM Phosphatpuffer pH 5 bei einer PASA-Konzentration von 0,2 mg/ml erzielt. Eine molare Konzentration von PASA kann nicht genau angegeben werden, da der Hersteller nur ein ungefähres Molekulargewicht benennt und eine unterschiedliche Länge der einzelnen Moleküle anzunehmen ist. Eine weitere Erhöhung der PASA-Konzentration zeigte keine Zunahme der angelagerten Masse, während niedrigere Konzentrationen diese senkten und die Reproduzierbarkeit verschlechterten. Die Proteinkonzentration wurde wie beim Aufbau der Monoschichten auf 20  $\mu$ M festgesetzt.

Die geringe Ionenstärke des verwendeten Puffers ist nötig, da die unterschiedlichen Ladungen ansonsten von den Pufferionen überdeckt und die elektrostatischen Wechselwirkungen unterbunden werden würden.

Die Inkubationszeit wurde auf 2,5 min verkürzt, da im Fließsystem die Anlagerung beider Substanzen auf der Oberfläche augenscheinlich nach 1-2 min abgeschlossen war.

Ein unter diesen Bedingungen gewonnenes Sensogramm ist in Abb. 4.1.1 gezeigt. Mit jedem Depositionsschritt wurde eine Erhöhung der auf dem Chip gebundenen Masse festgestellt. Dies zeigt den Aufbau der Multischichten aus Cyt.c und dem entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten.

Die Massenlagerung pro Schicht nahm mit steigender Schichtzahl zu.

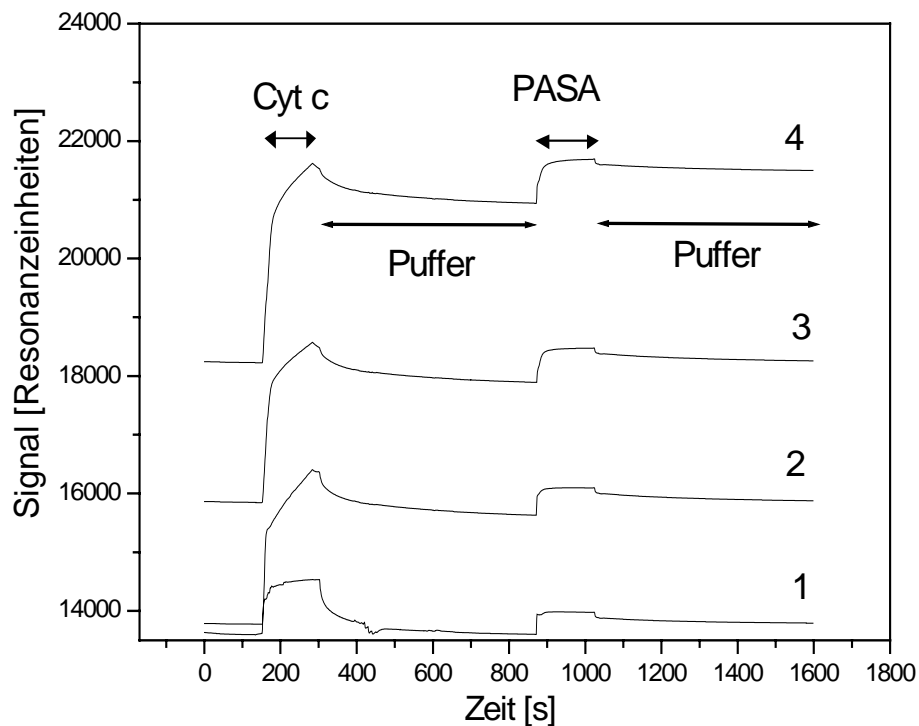


Abb. 4.1.1: Sensogramm eines Multischichtaufbaus durch sequentielle Deposition von Cyt.c und PASA auf einem MUA/MU-Cyt.c-modifizierten Goldchip, unterbrochen von Spülschritten mit Puffer. Zahlen (1-4) geben die jeweilige Depositionsrunde an.

Zu bemerken ist, dass in der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie bei gleicher Vorgehensweise auch ein Schichtaufbau mit PSS beobachtet wurde, der allerdings in der zyklischen Voltammetrie nicht zu einer Erhöhung der elektrochemischen Antwort der Cyt.c/PSS-Elektroden führte.

Diese optimierten Herstellungsbedingungen wurden für die Erstellung von Multischichtelektroden für weitere elektrochemische Untersuchungen verwendet.

Für die Untersuchung der Multischichten wurden diese in einem Tauchverfahren mit Hilfe des Roboters „Industry Robots“ der Firma Fischertechnik auf vorher präparierte Monoschichtelektroden aufgebracht.

#### 4.1.2 Elektrochemische Charakterisierung der Multischichtelektroden

Die Elektrochemie der Multischichten wurde mittels zyklischer Voltammetrie studiert. Als Parameter des Redoxsystems wurden die elektrochemisch aktive Proteinmenge, das formale Potential, die Peakbreite bei halber Höhe und die heterogene Elektronentransfergeschwindigkeitskonstante  $k_s$  untersucht und mit den entsprechenden Werten der Monoschichtelektrode verglichen. Außerdem wurde der Einfluss des pH-Werts auf die Elektrochemie der Multischichtelektroden untersucht.

Abbildung 4.1.2 zeigt zyklische Voltammogramme verschiedener Multischichtelektroden mit 4 bis 15 Schichten an Cyt.c. Zum Vergleich wurde die Kurve einer typischen Monoschichtelektrode hinzugefügt. Die Fläche der Redoxpeaks steigt mit steigender Anzahl an Schichten sichtbar an, d.h., jede aufgebrauchte Schicht an Cyt.c vergrößert das voltammetrische Signal. Die Zunahme von Reduktions- und Oxidationspeakfläche verläuft dabei parallel. Dies zeigt die elektrochemische Ansprechbarkeit der Proteinmoleküle in den Schichten des Systems.

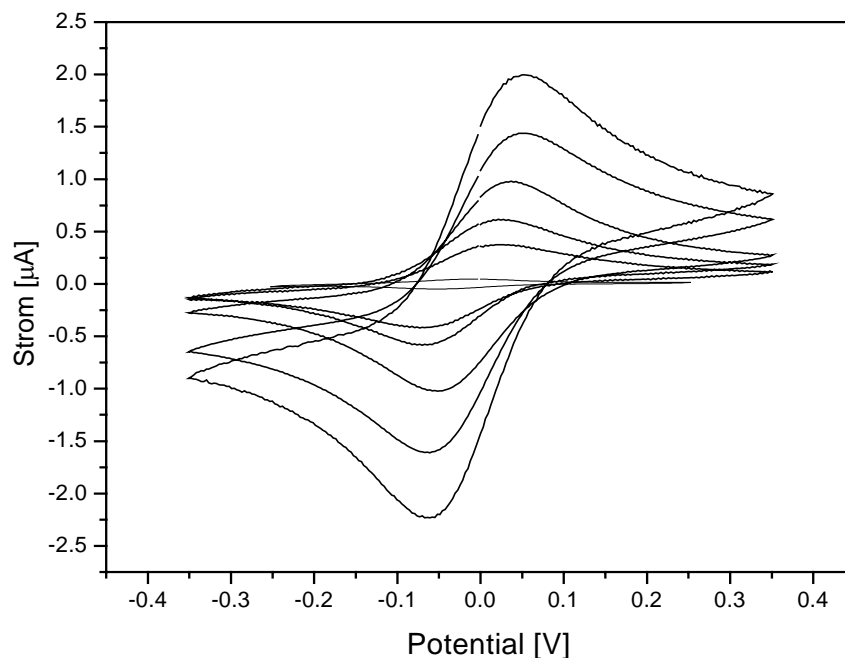


Abb. 4.1.2: Zyklische Voltammogramme von Multischichtelektroden. Mit steigender Peakfläche: Monoschicht, 4, 6, 8, 12, 15 Schichten an Protein (Scanrate 100 mV/s, Puffer 1)

Aus den Flächen der Peaks lässt sich mathematisch die Menge an elektroaktivem Protein auf der Elektrodenoberfläche bestimmen. Die Zunahme an elektroaktivem Protein wurde für 2 bis 15 Schichten ermittelt und zeigte eine lineare Zunahme mit steigender Zahl an Schichten. Für 15 Schichten wurde eine Proteinbeladung von  $640 \text{ pmol cm}^{-2}$  erzielt, was gegenüber den Monoschichtelektroden (etwa  $9 \text{ pmol cm}^{-2}$ ) einen Zuwachs um mehr als das 70-fache darstellt. Abb. 4.1.3 zeigt den Mittelwert der Beladung von je 8 Elektroden in Abhängigkeit der Zahl an aufgetragenen Proteinschichten.

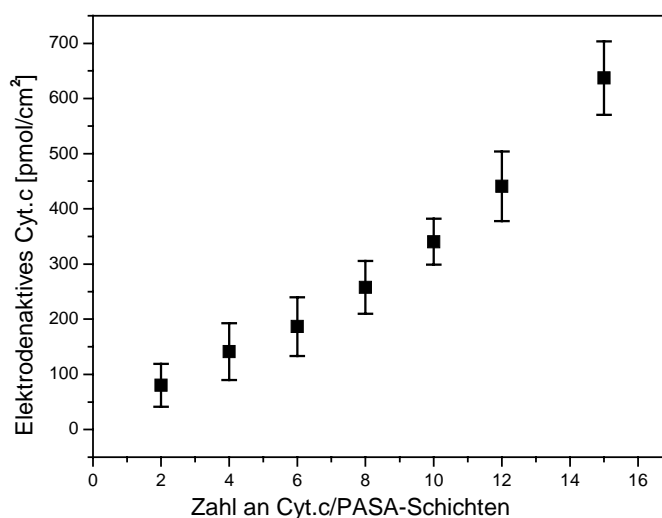


Abb. 4.1.3: Elektrodenaktive Menge an Cyt.c in Multischichtelektroden unterschiedlicher Schichtzahl.

Elektroden aus Kontrollexperimenten, in denen entweder die Protein- oder die Polyelektrolytlösung beim Aufbau der Schichten durch Puffer ersetzt wurden, erbrachten lediglich die elektrochemische Antwort einer Monoschichtelektrode, was die Notwendigkeit beider Substanzen für den Schichtaufbau nachweist und zeigt, dass die Zunahme der Peakflächen tatsächlich durch den Aufbau der neuartigen Struktur zu erklären ist.

Um zu untermauern, dass das elektrochemische Signal des Multischichtsystems auf die Häm-Gruppe des Proteins und nicht auf andere Einflüsse, etwa Redoxaktivitäten des Polyelektrolytbausteins zurückzuführen sind, wurde Apo-Cyt.c verwendet, welches keine Häm-Gruppe besitzt. Multischichtelektroden, bei denen auf einer mit häm-haltigen Protein

erstellten Monoschichtelektrode 4 Schichten PASA/Apo-Cyt.c aufgebaut wurden, zeigen lediglich Oxidations- und Reduktionspeaks in der Größenordnung einer Monoschichtelektrode. Die grundsätzliche Erzeugung von Multischichten aus PASA und Apo-Cyt.c wurde durch Oberflächenplasmonresonanz gezeigt (siehe Abb. 4.1.4). Das Schichtsystem aus PASA und Apo-Cyt.c ist also unter den gegebenen Messbedingungen zwar vorhanden, aber nicht elektroaktiv.

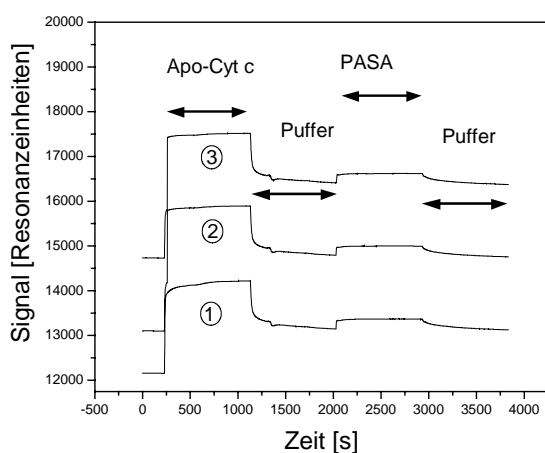


Abb. 4.1.4: Sensogramm eines Multischichtaufbaus durch sequentielle Deposition von Apo-Cyt.c und PASA auf einem MUA/MU-Cyt.c-modifizierten Goldchip, unterbrochen von Spülschritten mit Puffer. Zahlen (1-3) geben die jeweilige Depositionsrunde an.

PASA zeigt an einer MUA/MU modifizierten Elektrode sowie an einer Cyt.c-Monoschichtelektrode weder in Lösung noch nach einer bis zu 3-stündigen Inkubation bei pH 7 und einer Scanrate von 100 mV/s Elektroaktivität. Somit ist die Zunahme der Peakflächen bei Cyt.c/PASA-Multschichtelektroden eindeutig auf die zusätzlich gebundene Menge an Cyt.c zurückzuführen.

Für Elektroden mit 2-15 Schichten Cyt.c lag das formale Potential bei  $-15 \pm 7$  mV und veränderte sich mit zunehmender Zahl an Schichten nicht. Dieser Wert liegt innerhalb der Fehlerbreite des formalen Potentials für eine Cyt.c-Monoschicht adsorbiert auf einer MUA/MU-modifizierten Goldelektrode ( $-19 \pm 5$  mV). Die Bindung im Multischichtsystem und die Interaktion mit dem Polyelektrolyten beeinflusst das formale Potential des Proteins offenbar nicht. Somit ist von einer mit den Cyt.c-Monoschichtelektroden ähnlichen Situation des Proteins auszugehen.



Die Peakbreite bei halber Höhe lag für 6-Schichtelektroden bei  $180 \pm 9$  mV, und damit höher als für das Monoschichtsystem ( $130 \pm 5$  mV). Grundsätzlich weist das auf eine größere Heterogenität der Proteinzustände bei den Multischichtelektroden hin, was durchaus einleuchtend ist, da die Proteinmoleküle sich in Mikroumgebung und Orientierung gegenüber der Elektrodenoberfläche stärker voneinander unterscheiden, als dies bei einer Monoschichtelektrode der Fall ist.

Eine Variation der Scangeschwindigkeit in der zyklischen Voltammetrie sollte Einblick in die Kinetik der Redoxprozesse geben und die heterogene Elektronentransfergeschwindigkeitskonstante  $k_s$  liefern. Dabei wird eine Zunahme der Peakseparation bei steigenden Scangeschwindigkeiten gemessen und daraus nach Laviron (Laviron 1978) die Konstante  $k_s$  errechnet.

Bei der Untersuchung des Multischichtsystems war mit Erhöhung der Scangeschwindigkeit eine deutliche Abnahme der Peakflächen zu verzeichnen, was einer Verringerung der Menge an von der Elektrode kontaktierbarem Protein entspricht.

In Abb. 4.1.5 ist dieser Befund für zwei 8-Schichtelektrode dargestellt: Die Ausgangsmenge an elektrochemisch kontaktierbarem Protein bei einer Scanrate von 100 mV/s wurde auf 100% gesetzt und die ermittelten elektroaktiven Proteinbeladungen bei höheren Scangeschwindigkeiten prozentual gegen diese aufgetragen. Dieser Anteil fällt exponentiell ab. Schon eine Erhöhung der Scangeschwindigkeit von 100 auf 125 mV/s führt zu einem Verlust von 40% an redoxaktivem Protein, ab etwa 10 V/s sind nur noch 10% der Ausgangsmenge ansprechbar.

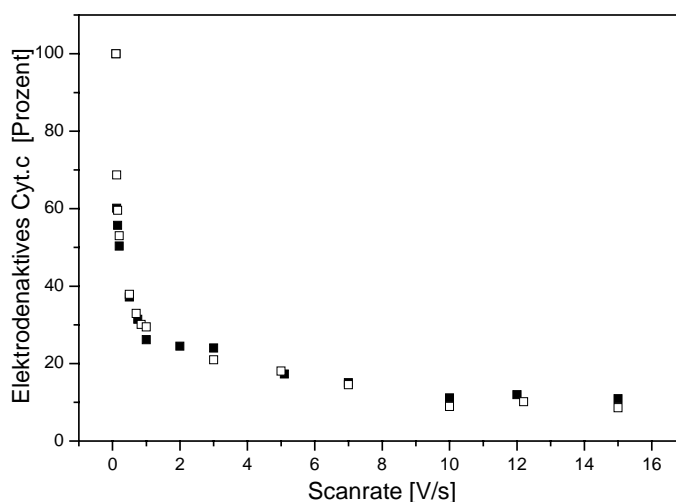


Abb. 4.1.5: Elektrodenaktive Menge an Cyt.c in zwei 8-Schichtelektroden in Abhängigkeit von der Scanrate in Prozent. Der Wert für eine Scanrate von 100 mV/s wurde auf 100% gesetzt.

Eine Rückkehr zur Ausgangsgeschwindigkeit von 100 mV/s hob diesen Effekt wieder auf, und die Peakflächen entsprachen den Werten vor Beginn der Scangeschwindigkeitsvariation.

Dieses Verhalten ist also nicht auf eine Desorption von Proteinmolekülen von der Oberfläche zu erklären, sondern durch einen temporären Verlust an elektrochemischem Kontakt, der durch Zurückführung der Scangeschwindigkeit wieder aufgehoben werden konnte.

Beim Unterschreiten der Scangeschwindigkeit von 100 mV/s hingegen veränderte sich die Menge an elektroaktivem Protein nicht; bei 50 mV/s sind die Peakflächen im Rahmen der Messgenauigkeit gleich denen bei 100 mV/s.

Dieses Verhalten ist insofern erklärlich, da die Geschwindigkeit des Elektronentransfers zwischen Elektrodenoberfläche und den Proteinen in den verschiedenen Schichten nicht für alle Proteinmoleküle gleich ist, sondern von der Distanz zwischen Protein und Oberfläche, also auch von der jeweiligen Schicht abhängig ist. Eine Anhebung der Scangeschwindigkeit auf 125 mV/s überschreitet also schon die minimale Elektronentransferrate im Multischichtsystem, so dass mit fortschreitender Erhöhung der Scangeschwindigkeit der Kontakt zu immer mehr Schichten abbricht.

Legt man also eine Scangeschwindigkeit von 100 mV/s für einen Kontakt zu allen Proteinmolekülen im Multischichtsystem zu Grunde, so ergibt sich ein minimaler  $k_s$ -Wert

von etwa  $1,5 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$ . Dieser ist wohl hauptsächlich zutreffend für die Cyt.c-Moleküle in den äußeren Schichten des Systems und liegt drastisch unter dem einer Monoschichtelektrode mit adsorbiertem Cyt.c ( $75 \pm 3 \text{ s}^{-1}$ ).

Die Redoxchemie der Multischicht-Elektrode wurde im pH-Bereich zwischen 5 und 8 untersucht und mit der von Cyt.c-Monoschichtelektroden verglichen. Die formalen Potentiale sanken mit steigendem pH-Wert linear für beide Elektrodentypen mit einer Steigung von  $-51 \text{ mV/pH-Einheit}$  gleichartig. Dies weist auf die Beteiligung von Protonen auf den Redoxprozess hin.

Unterschiede fanden sich in der Kinetik der elektrochemischen Vorgänge bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Peakseparation bei  $100 \text{ mV/s}$  blieb bei Monoschichtelektroden zwischen pH 5 und 9 konstant. Die entsprechenden Werte der Multischichtelektroden hingegen zeigten ein Minimum bei pH 7 und stiegen bei höheren und niedrigeren pH-Werten an (siehe Abb. 4.1.6).

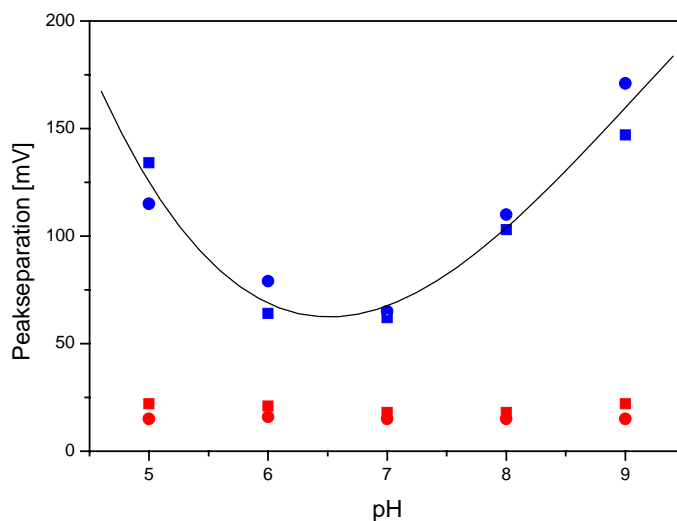


Abb. 4.1.6: Peakseparation von Cyt.c-Elektroden in Abhängigkeit vom pH-Wert. Blau: zwei 8-Schichtelektroden. Rot: zwei Monoschichtelektroden (Scanrate  $100 \text{ mV/s}$ , Puffer 1)

Die Peakseparation ist direkt mit der Geschwindigkeit des Elektronentransfers verknüpft; somit konnte bei den Multischichtelektroden im sauren und basischen Bereich eine Verlangsamung des Elektronenaustausches festgestellt werden. Da die Variation des pH-Wertes auch eine Veränderung der Nettoladung des Proteins mit sich bringt, ist ein Einfluss des pH-Wertes auf die Struktur des Multischichtsystems, das auf elektrostatischen

Wechselwirkungen und somit auf den unterschiedlichen Ladungen beruht, anzunehmen. Eine Veränderung der Nettoladung könnte zu einem Unterschied in der Mikroumgebung der Häm-Gruppe des Proteins oder der Rigidität bzw. Flexibilität der Schichten führen, was wiederum die Geschwindigkeit der Reduktions- und Oxidationsprozesse beeinflusst. Daher ist die Kinetik des Elektronentransfers im Multischichtsystem im Gegensatz zur Monoschichtelektrode stark pH-abhängig.

Im neutralen Bereich scheint die Struktur für einen schnellen Elektronenaustausch zwischen Elektrode und Proteinschichten am vorteilhaftesten zu sein, was zu der geringsten Peakseparation bei pH 7 führt.

## Diskussion

Multschichten aus dem Polyelektrolyt PASA und dem Protein Cyt.c konnten nach dem *Layer-by-layer*-Prinzip auf einer Cyt.c-Monoschichtelektrode aufgebaut werden. Die Proteinmoleküle in den aufgetragenen Schichten zeigten im zyklischen Voltammogramm einen quasi-reversiblen Elektronentransfer zur Elektrode. Kontrollexperimente zeigten die Notwendigkeit beider Komponenten für den Strukturaufbau und konnten die elektrochemischen Signale eindeutig auf die Häm-Gruppe der immobilisierten Proteinmoleküle zurückführen.

Die von der Elektrode kontaktierbare Menge an Cyt.c stieg mit zunehmender Zahl an Schichten kontinuierlich an und erreichte bei 15 Proteinschichten das 70-fache einer Monoschichtelektrode.

Eine derartige Erhöhung der Proteinbeladung wurde in elektroaktiven Multischichtsystemen nach bestem Wissen des Autors nie zuvor publiziert. Beispielsweise veröffentlichten He et. al. Ergebnisse einer elektroaktiven Multischichtanordnung aus Hämoglobin und Poly(diallyldimethylammonium) und erreichten mit einer 9-Schichtelektrode eine Erhöhung der elektroaktiven Menge von etwa  $20 \text{ pmol cm}^{-2}$  für eine Monoschicht auf ca.  $50 \text{ pmol cm}^{-2}$  nach Aufbau von 9 Schichten (He et al. 2002). Für eine Multischichtelektrode aus Myoglobin und PSS veröffentlichten Ma et. al. einen Anstieg der elektroaktiven Proteinbeladung von etwa  $40 \text{ pmol cm}^{-2}$  (Monoschicht) auf knapp  $140 \text{ pmol cm}^{-2}$  (7-Schichtelektrode) (Ma et al. 2000). In beiden Fällen ist außerdem ein hyperbolischer Kurvenverlauf bei der Auftragung der redoxaktiven Proteinbeladung gegen

die Schichtzahl zu beobachten. Die Proteinbeladung zwischen der letzten und der vorherigen Schicht weist in beiden Fällen nur noch einen geringen Unterschied auf, und eine weitere Zunahme der elektroaktiven Proteinbeladung scheint ausgeschlossen. Da massebasierte Nachweissysteme wie etwa Quarzmikrowaagen (QCM) einen Aufbau von deutlich mehr Proteinschichten zeigen, scheint mit steigendem Abstand der Schichten zur Elektrodenoberflächen in den Systemen mit Hämoglobin und Myoglobin der elektrische Kontakt zwischen Protein und Elektrodenoberfläche abzureissen.

Im in dieser Arbeit beschriebenen System hingegen scheint der Zuwachs an elektroaktivem Protein auch bei 15 Schichten in Abb. 4.1.3 nicht beendet zu sein. Elektroden mit mehr als 15 Schichten wurden aus praktischen und zeitlichen Gründen nicht mehr untersucht, lassen aber ein weiteres Ansteigen der Menge an redoxaktivem Cyt.c im System vermuten. Somit unterscheidet sich das hier vorgestellte elektroaktive Multischichtarrangement deutlich von anderen auf diesem Feld publizierten Arbeiten.

Das formale Potential der Multischichtelektroden entsprach dem der Monoschichtelektroden und verhielt sich auch bei einer pH-Variation wie dieses. Die Elektronentransfergeschwindigkeit im Multischichtsystem ist für die Proteine in den verschiedenen Schichten je nach Entfernung zur Elektrodenoberfläche unterschiedlich. Eine Erhöhung der Scangeschwindigkeit führt schnell zu einem fortschreitenden Kontaktverlust zwischen der Elektrode und einem Teil der Proteinmoleküle in den äußeren Schichten. Betrachtet man die heterogene Elektronentransfergeschwindigkeitskonstante  $k_s$  bei der Scanrate, die Kontakt zu allen ansprechbaren Cyt.c-Molekülen in der Multischichtstruktur gewährleistet, ist diese wesentlich geringer als im Monoschichtsystem.

Die Kinetik des Redoxprozesse ist bei den Multischichten pH-abhängig. Der Elektronentransfer ist im neutralen Bereich am schnellsten.

Diese Ergebnisse sprechen für eine Verwendung des Multischichtsystems als Superoxidsensor, da die elektroaktive Menge an Cyt.c drastisch erhöht werden konnte und das formale Potential im Vergleich zu den bisher eingesetzten Monoschichtelektroden unverändert bleibt. In früheren Arbeiten wurde festgestellt, dass die Geschwindigkeitskonstante des heterogenen Elektronentransfers hauptsächlich die Linearität der Signalentstehung bei höheren Radikalkonzentrationen, über 10  $\mu\text{M}$ , limitiert

(Ge und Lisdat 2002). Für den *in vivo* und *in vitro* zu untersuchenden Konzentrationsbereich (nM bis wenige  $\mu\text{M}$ ) ist die Geschwindigkeit des Elektronentransfers der Multischichtelektroden daher ausreichend.

Die Unterschiede im Vergleich zu anderen Protein-Multischichtelektroden legen nahe, den Mechanismus des Elektronentransportes genauer zu untersuchen.

#### 4.1.3 Mechanismus des Elektronentransportes in Cyt.c/PASA-Multischichten

Aufgrund der Schichtdicken, die bei Polyelektrolyt-Multischichtsystemen erzielt werden (etwa 4-10 nm pro Schicht) (Lvov und Möhwald 1999), ist offenkundig, dass der Elektronentransfer zwischen Goldoberfläche und den Proteinen in den äußeren Schichten nicht direkt, etwa durch Tunneling, erfolgen kann, sondern über mehrere Schritte vermittelt sein muss. Prinzipiell sind dabei zwei mögliche Mechanismen zu berücksichtigen: Der Polyelektrolyt könnte als eine Art molekularer Draht („*molecular wire*“) wirken, wobei Elektronen von den Hämgruppen an den Polyelektrolyten abgegeben und über diesen an die Elektrode vermittelt werden und somit eine Oxidation und Reduktion von PASA aufträte. Andererseits könnte das Elektron von Proteinmolekül zu Proteinmolekül über die exponierte Häm-Ecke transportiert werden. Bei diesem rein proteinvermittelten Transportmechanismus käme dem Polyelektrolyten also lediglich eine strukturelle Rolle beim Aufbau der Schichten zu, ohne direkt in den Elektronentransfer involviert zu sein.

Obwohl ein Mechanismus basierend auf Proteindiffusion aus Gründen von Struktur und Kinetik der Multischichtarchitektur eher unwahrscheinlich erscheint, war auch diese Möglichkeit nicht völlig auszuschließen.

Verschiedene Untersuchungsansätze wurden überprüft, um Einblick in diese Fragestellung zu erhalten.

Erste Hinweise lieferte die Beobachtung, dass 20  $\mu\text{g/ml}$  PASA in der Messlösung im untersuchten Scanbereich an einer nackten sowie einer promotormodifizierten Goldelektrode keine Oxidations- und Reduktionspeaks zeigte. Auch nach dreistündiger Inkubation änderte sich dieser Befund nicht. Sollte unter den Untersuchungsbedingungen der Multischichtelektroden, d.h. bei neutralem pH-Wert und der verwendeten Scanrate von 100 mV/s, Oxidation und Reduktion des Polyelektrolyten als Mechanismus des

Elektronentransfers dienen, so wäre ein Auftreten von Redoxpeaks auch ohne Gegenwart des Proteins wahrscheinlich. Dies wurde aber nicht beobachtet.

#### **4.1.3.a Einbau elektro-inaktiver Apo-Cyt.c-Zwischenschichten**

Weitere Experimente mit dem häm-freien Apo-Cyt.c wurden unternommen, um diese Fragestellung zu klären. Es wurden Multischichtelektroden auf einer MUA/MU-Cyt.c-Monoschicht aufgebaut, bei denen die ersten zwei bis 12 Schichten nur Apo-Cyt.c. enthielten, auf die dann 4 weitere Schichten mit häm-haltigem Cyt.c. folgten. Sollte der Elektronentransfer über einen Protein-Protein-Mechanismus verlaufen, so würden diese Apo-Cyt.c-Schichten eine effektive Barriere darstellen und die hinteren, häm-haltigen Schichten daher keine elektrische Verbindung zur Elektrode besitzen. In diesem Falle wären im zyklischen Voltammogramm Peaks in der Größenordnung von Monoschichtelektroden zu erwarten. Ein Elektronentransfer über den Polyelektrolyten andererseits wäre von einer solchen Barriere nicht oder nur wenig beeinflusst, weshalb Redoxvorgänge der äußeren, häm-haltigen Cyt.c-Schichten zu beobachten sein müssen.

Als Kontrolle der erfolgreichen Entfernung der Häm-Gruppe und dem daraus resultierenden Verlust der Redoxaktivität wurden Monoschichtelektroden vom Typ MUA/MU-Apo-Cyt.c hergestellt. Diese zeigten im zyklischen Voltammogramm wie erwartet keine Reduktions- und Oxidationspeaks.

Eine SDS-Gelelektrophorese zeigte für das präparierten Apo-Cyt.c eine einzelne Bande in Höhe der Bande von Cyt.c (s. Abb. 4.1.7) und verifizierte somit die Integrität des Proteins nach der chemischen Behandlung zur Entfernung der Häm-Gruppe.

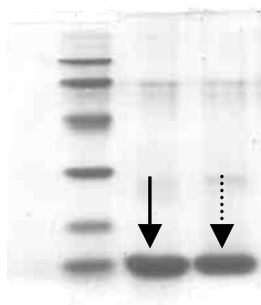


Abb. 4.1.7: Ausschnitt einer SDS-Gelelektrophorese von Cyt.c (kompakter Pfeil) und Apo-Cyt.c (Pfeil gepunktet). Links aussen: Größenstandard (von unten: 14,4; 20,1; 30; 43; 67; 94 kDa).

Daraufhin wurden Multischichtelektroden mit 4, 8 und 12 Schichten Apo-Cyt.c als Barriere und darauf folgend 4 Schichten redoxaktivem Cyt.c erstellt und zykvoltammetrisch untersucht.

Zyklische Voltammogramme derartiger Systeme sind in Abb. 4.1.8 dargestellt.

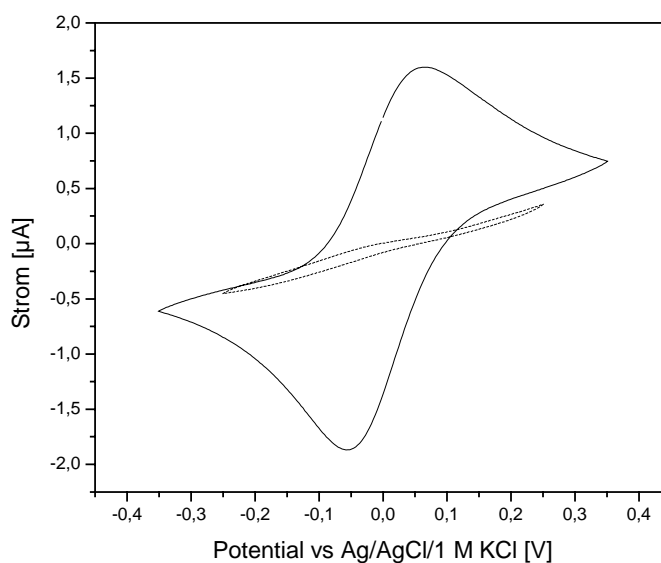


Abb. 4.1.8: Zyklische Voltammogramme von Multischichtelektroden mit Apo-Zwischenschichten.  
Durchgezogene Linie: 4 Apo-Cyt.c-Zwischenschichten. Gepunktet: 12 Apo-Cyt.c-Zwischenschichten (100 mV/s, Puffer 1)

Der Aufbau von Multischichten mit Apo-Cyt.c wurde durch SPR-Untersuchungen verifiziert (s. Abb. 4.1.4).



Eine Elektrode mit 4 Apo-Cyt.c-Zwischenschichten gab die voltammetrische Antwort einer Apo-Cyt.c-freien Multischichtelektrode und zeigte somit, dass der Kontakt zu den äußeren 4 Schichten nicht durch 4 Schichten Apo-Cyt.c unterbrochen wurde.

Wurde die Barriere aus Apo-Cyt.c auf 8-12 Schichten ausgedehnt, so war keine Redoxaktivität der häm-haltigen Cyt.c-Moleküle der äußeren Schichten mehr zu beobachten. Eine ausreichend dichte Barriere aus Apo-Cyt.c kann also den Elektronentransfer im Multischichtsystem komplett unterbinden.

Die vollständige Unterbrechung des Elektronentransportes durch die Einführung mehrerer Schichten aus Apo-Cyt.c spricht gegen einen Elektronentransport über den Polyelektrolyten, da dessen Funktion durch Verwendung des Apo-Cyt.c nicht entscheidend beeinträchtigt sein sollte. Dies ist ein erstes Argument für eine direkte Redoxreaktion zwischen den Proteinmolekülen innerhalb der Multischichtstruktur. Die Durchlässigkeit von 4 Schichten Apo-Cyt.c zeigt, dass die Struktur des Multischichtaufbaus nicht aus separaten, streng aufeinander folgenden Schichten besteht, sondern eher ein komplexes Netzwerk bildet, innerhalb dessen mehrere Schichten einander durchdringen. Somit befinden sich in den 4 Apo-Schichten auch häm-haltige Cyt.c-Moleküle, die einen Elektronentransport ermöglichen. Eine derartige Netzwerkstruktur wurde schon für andere Multischichtsysteme auf Polyelektrolytbasis beobachtet und kann auch hier angenommen werden. Lvov und Mitarbeiter berichten, dass ein derartiger Effekt insbesondere für die ersten 4-6 Schichten eines *Layer-by-layer*-Gefüges häufig auftritt (Lvov et al. 1993).

#### **4.1.3.b Verdünnung mit Apo-Cyt.c**

Des Weiteren wurden Multischichten aus Gemischen von häm-haltigen Cyt.c und häm-freien Apo-Cyt.c erstellt. Hierbei wird eine Verdünnung der Konzentration des häm-haltigen Cyt.c in den Schichten erwartet, da die SPR-Untersuchungen ein ähnliches Anlagerungsverhalten beider Substanzen nahelegen. Diese Verdünnung hätte je nach Modell unterschiedliche Auswirkungen auf die elektrochemischen Charakteristika der Elektroden. Bei Annahme eines PASA-Draht-Modells sollten die Peakflächen im Vergleich zu rein häm-haltigen Systemen recht exakt um den Anteil an Apo-Cyt.c sinken, d.h. eine Elektrode mit 30% Apo-Cyt.c sollte um etwa 30% verkleinerte Peakflächen

zeigen. Sollte der Elektronentransfer allerdings ausschließlich über die redoxaktiven Zentren der Proteine verlaufen, wäre eine deutlichere Abnahme der Peakflächen zu erwarten, da nicht nur die Zahl an Hämgruppen sänke, sondern auch die Verbindung zwischen den Schichten beeinträchtigt wäre. Somit würden an sich elektroaktive Proteinmoleküle nicht mehr mit der Elektrode kommunizieren können, was zu einem deutlicheren Absinken der Peakflächen führen müsste.

6-Schicht-Elektroden wurden erstellt, bei denen der Anteil an redoxaktivem Protein zu 10 bis 40% durch redox-inaktives Apo-Cyt.c ersetzt wurde. Elektroden mit 10% Apo-Cyt.c zeigten im zyklischen Voltammogram keine grossen Unterschiede zu Apo-Cyt.c-freien Systemen. Die Erhöhung des Apo-Cyt.c-Anteils auf 30% und 40% hingegen führte zu einer drastischen Abnahme der Menge an elektroaktivem Protein. Beispielsweise sank die Menge an redoxaktivem Protein bei einer Multischichtelektrode mit 40% Apo-Cyt.c im Vergleich mit einer Apo-Cyt.c-freien Multischichtelektrode auf ein Fünftel. Dieser Verlust an elektrochemischem Signal lag somit drastisch über dem prozentualen Anteil an Apo-Cyt.c und kann durch diesen allein nicht erklärt werden. Außerdem wurde eine Zunahme der Peakseparation festgestellt, die eine Verlangsamung des Elektronentransportprozesses nahelegt.

SPR-Untersuchungen von Ansätzen mit 10%, 40% und 100 % Apo-Cyt.c zeigten nur geringe Schwankungen in der Menge an gebundenem Protein, so dass trotz der Veränderungen in der Struktur (Stellwagen et al. 1972) von Cyt.c durch die chemische Entfernung der Häm-Gruppe ein erfolgreicher Multischichtaufbau mit Apo-Cyt.c/Cyt.c-Gemischen erzielt werden konnte.

Eine schlechtere Strukturbildung in Gegenwart von Apo-Cyt.c ist als Grund der Abnahme an elektroaktivem Protein in der zyklischen Voltammetrie daher nicht anzunehmen.

Beide Beobachtungen sprechen für einen Protein-Protein-Elektronentransfermechanismus und deuten somit darauf hin, dass der Polyelektrolyt nur eine strukturelle Funktion im Aufbau des Netzwerkes hat.

#### 4.1.3.c Einfluss kovalenter Verknüpfungen im Multischichtassemblat

Der Einfluss einer kovalenten Verknüpfung freier Carboxyl- und Aminogruppen durch EDC-Zugabe nach Aufbau der Multischichtelektroden wurde ebenfalls untersucht.

Die Inkubation mit EDC führte zu einer deutlichen Veränderung der Elektrochemie in den Multischichtsystemen. Eine 30-minütige EDC-Behandlung einer Apo-Cyt.c-freien Multischichtelektrode bewirkte einen irreversiblen Verlust an elektroaktivem Protein (etwa 35 %) und eine deutlichen Erhöhung der Peakseparation (siehe Abb. 4.1.9).

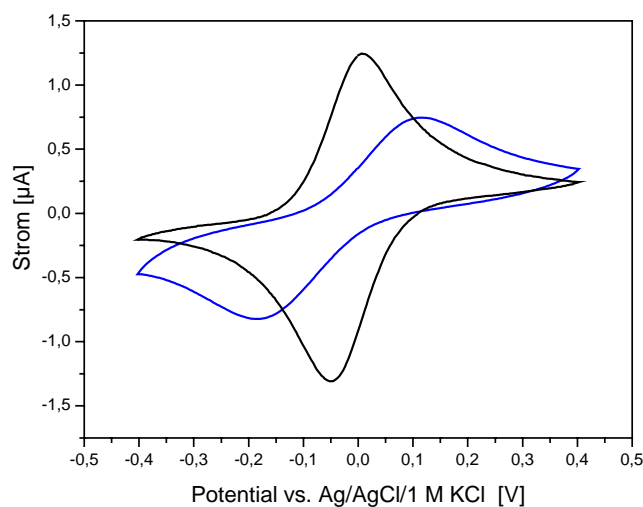


Abb. 4.1.9: Einfluss von EDC auf eine 6-Schichtelektrode. Schwarz: vor EDC-Behandlung. Blau: nach 30-minütiger EDC-Behandlung (100 mV/s, Puffer 1)

So zeigten 6-Schicht-Elektroden vor einer Inkubation mit EDC eine Peakseparation von 80 mV bei einer Scanrate 100 mV/s. Nach einer solchen Behandlung erhöhte sich dieser Wert auf 280 mV, was eine Verringerung der Geschwindigkeit des Elektronentransferprozesses nahe legt. Dies führt zu dem Schluss, dass die Flexibilität der Moleküle innerhalb der Multischichtanordnung eine wichtige Rolle für den schnellen und effizienten Elektronentransport spielt.

Auch auf das Verhalten von Multischichtelektroden mit 4 Apo-Cyt.c-Zwischenschichten vor 4 Schichten PASA/Cyt.c zeigte EDC einen Einfluss. Vor der EDC-Behandlung wurde Elektronentransfer zu den häm-haltigen Proteinen der äußeren 4 Schichten beobachtet.

Wurde eine solche Elektrode jedoch für 30 min mit EDC inkubiert, so waren keine Redoxpeaks der hinteren Cyt.c-haltigen Schichten mehr zu beobachten

Die Barriere aus 4 Schichten Apo-Cyt.c, verbunden mit der eingeschränkten Flexibilität des Systems durch Zugabe von EDC unterbricht also die elektrochemische Kommunikation zwischen den Proteinen in der äußeren Schicht mit der Elektrode.

Die Ergebnisse der kovalenten Verknüpfungen unterstreichen die Bedeutung der Flexibilität der Proteinmoleküle innerhalb des Systems.

#### **4.1.3.d Einbau des Polyelektrolyten PSS**

Um die Bedeutung der Rotationsflexibilität des Proteins im Multischichtsystem zu untersuchen, wurde der im Vergleich zu PASA stärkere Polyelektrolyt PSS eingesetzt. Dieser könnte stärkere Bindungen mit dem Protein eingehen und so dessen Flexibilität einschränken.

Die Vorexperimente in Abschnitt 4.1.1a hatten gezeigt, dass Multischichten aus PSS und Cyt.c zwar erstellt werden können, die Proteine innerhalb eines solchen Systems aber keinen Elektronentransfer zur Elektrode durchzuführen vermögen.

Deshalb wurde der PASA-Lösung unter Beibehaltung ihrer Konzentration PSS in einer Konzentration zwischen 25% und 150% der PASA-Konzentration (also zwischen 0,05 und 0,3 mg/ml) zugesetzt und damit PASA im Strukturaufbau verdünnt.

Mit dieser Lösung erstellte Multischichtelektroden zeigten Redoxaktivität des Proteins in den Schichten ohne Veränderung des formalen Potentials. Allerdings wurden die Peakströme mit steigendem Anteil an PSS deutlich kleiner.

Die Zahl an Cyt.c-Molekülen, die mit der Elektrode kommunizieren konnte, sank also spürbar, je höher der Anteil des starken Polyelektrolyten in der PASA-Lösung und somit auch innerhalb der Multischichtstruktur war. Abb. 4.1.10 zeigt den Einfluss dieser PSS-Zusätze auf die voltammetrische Antwort von 6-Schichtelektroden.

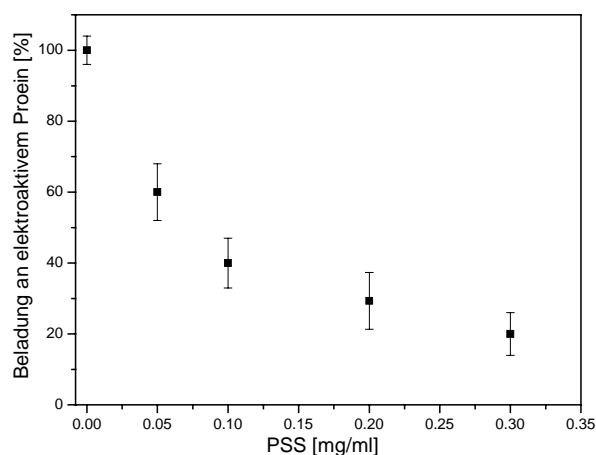


Abb. 4.1.10: Proteinbeladung von 6-Schichtelektroden mit 25-150% PSS-Zusatz in der PASA-Lösung (0,2mg/ml, unverändert). Beladung von PSS-freien Elektroden auf 100% gesetzt. Mittelwerte von je 4 Elektoden.

Die Einschränkung der Rotationsflexibilität des Proteins erschwert offenbar den Elektronentransfer zur Elektrode.

## Diskussion

Die Ergebnisse dieser Experimente sprechen klar für ein Inter-Protein-Elektronentransfermodell. Die Annahme eines solchen Mechanismus kann die Unterschiede zu den diskutierten Myoglobin- und Hämoglobinarchitekturen (He et al. 2002; Ma et al. 2000) erklären, bei denen von einem anderen Elektronentransportmechanismus, vermutlich einem direkten Kontakt zwischen Elektrodenoberfläche und Protein, auszugehen ist. Die Geschwindigkeit der *self-exchange*-Reaktion, also des Austausches von Elektronen zwischen den jeweiligen Proteinmolekülen, liegt für Myoglobin ( $10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) und Hämoglobin ( $10^{-3} \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) um mehrere Größenordnungen unter der von Cyt.c (ca.  $10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Dryhurst et al. 1982). Somit erscheint die Geschwindigkeit des *self-exchange*-Prozesses für Myoglobin und Hämoglobin nicht ausreichend, um einen Elektronentransfer basierend auf Inter-Protein-Elektronenaustausch für eine grössere Anzahl an Proteinschichten zu gewährleisten. Im Falle des Cyt.c hingegen ist dieser offensichtlich möglich.

Das Vorliegen eines solchen Elektronentransfermechanismus ist als Grund für die um Größenordnungen bessere Zunahme an elektroaktivem Protein pro Schicht im Cyt.c-Multischichtgefüge plausibel.

Die Beobachtungen dieser Experimente erlauben auch den Ausschluss von Modellen, die eine Diffusion der Proteinmoleküle als Grundlage des Elektronentransfers annehmen. Die Abnahme der Redoxantwort bei Verwendung von Apo-Cyt.c innerhalb des Systems würde eine Diffusion von redoxaktivem Cyt.c zur Elektrodenoberfläche nicht entscheidend verhindern und kann somit die drastische Abnahme an elektrochemischem Signal in den verschiedenen Ansätzen nicht erklären. Des Weiteren spricht die Lagerungsstabilität der Multischichtelektroden in Pufferlösung gegen eine Proteindiffusion. Eine Inkubation der Elektroden in Puffer über Nacht führte nur zu einem vernachlässigbaren Verlust an elektroaktivem Protein. Sollte eine Diffusion aus den äußeren Schichten durch das Netzwerk zur Elektrodenoberfläche im Zeitrahmen der elektrochemischen Messungen (wenige Minuten) möglich sein, so würde dies im Umkehrschluss während der Lagerung eine Diffusion des Proteins aus der Struktur in die Lösung nahe legen, die im untersuchten Zeitraum einen drastischen Verlust an Protein nach sich ziehen müsste. Schließlich ist der Schichtaufbau zur Lösung hin nicht durch eine Membran oder ähnliches zusätzlich stabilisiert. Ein Ausbleiben dieses Verlustes zeigt klar, dass eine Diffusion der Proteinmoleküle innerhalb des Systems als Mechanismus des Elektronentransfers auszuschließen ist.

Das hier vorgeschlagene Modell setzt eine *face-to-face*-Orientierung der Proteinmoleküle für den Elektronenaustausch und deren schnelle Reorientierung voraus. Dies kann nur durch Rotationsflexibilität des Cyt.c im Multischichtnetzwerk erzielt werden, was für Cyt.c-Moleküle an einer Alkanthiol-Promotorschicht bereits beschrieben wurde (Avila et al. 2000). Offensichtlich ist die Interaktion zwischen PASA und Cyt.c nicht so stark, dass eine solche Flexibilität ausgeschlossen wäre. Dies kann auch das Fehlen der Redoxaktivität von Proteinmolekülen in den Cyt.c/PSS-Multischichtstrukturen erklären, da PSS als starker Polyelektrolyt das Protein fester bindet und somit vermutlich die Orientierung der Proteinmoleküle zueinander behindert.

Neuere Untersuchungen der Cyt.c-Multischichten mit elektrochemischen und QCM-basierten Methoden zeigten, dass für 4 bis 15 Proteinschichten so gut wie alle gebundenen Moleküle auch elektrochemisch ansprechbar waren (Beissenhirtz et al. 2005). Im

Vergleich zu den Arbeiten an Hämoglobin- und Myoglobin-Multischichten (He et al. 2002; Ma et al. 2000) geht also mit steigender Schichtzahl der Kontakt zu den gebundenen Proteinmolekülen nicht verloren. Im Falle der Cyt.c-Multischichten wird daher eine erstaunliche elektrochemische Ansprechbarkeit von etwa 100% aller gebundenen Proteinmoleküle erreicht.

Ein Protein-Protein-Elektronentransfermechanismus wurde bereits für ein diffusionsbasiertes System diskutiert (McKenzie und Marken 2003), bei dem Cyt.c aus der Lösung in vorher aufgebaute Multischichtstrukturen aus  $\text{TiO}_2$  und Phytinsäure hineindiffundiert. Hierbei wurde ebenfalls eine deutliche Zunahme des Redoxsignals des Proteins bei steigender Anzahl der aufgebauten Schichten erzielt. Von den Autoren wurde eine Abnahme des Diffusionskoeffizienten des Proteins innerhalb der Multischichtstruktur im Vergleich zum Zustand in Lösung als Begründung eines Protein-Protein-Elektronentransfers angeführt. Allerdings ist die Diffusion der Proteinmoleküle innerhalb des Systems zwar deutlich verlangsamt, aber immer noch verhaltensbestimmend, so dass ein derartiger Aufbau in praktischen Anwendungen wie der Sensorik auf Grund von diffusionslimitierten Redoxprozesse und Stabilitätsproblemen wenig Erfolg versprechend scheint.

Die Summe der gewonnenen Erkenntnisse zeigt, dass der Elektronenaustausch zwischen Cyt.c in den Schichten und der Goldoberfläche nur durch eine Redoxreaktion zwischen den Proteinmolekülen selbst erklärlich ist. PASA dient dabei der Konstruktion des flexiblen Multischichtsystems, nicht der Übertragung von Elektronen. Dieser Mechanismus ist die Grundlage für die bislang für derartige Multischichtsysteme unerreichte Zunahme der Menge an elektroaktivem Protein.

#### **4.1.4 Anwendung als Superoxidsensor**

Die elektrochemischen Eigenschaften der Multischichtelektroden legen eine Untersuchung des neuartigen Systems als empfindliche Superoxidsensoren nahe. Der beträchtliche Zuwachs an kontaktierbarem Protein auf der Elektrode verspricht eine spürbare Zunahme der Empfindlichkeit im Vergleich zu den bisher genutzten Monoschichtelektroden, deren

Sensitivität durch die gebundene Proteinmenge limitiert ist. Die Unterschiede in kinetischen und thermodynamischen Parametern stellen dem kein Hindernis entgegen.

Die Signalkette für die sensorische Superoxiddetektion beruht auf der Weitergabe eines Elektrons vom Radikal zum Protein und weiter zur Elektrode, an welcher daraufhin ein katalytischer Strom fließt, der als Signal genutzt werden kann. Cyt.c-Elektroden werden gewöhnlich in einem amperometrischen Messansatz verwendet. Das Elektrodensystem wird für die Dauer der Messung konstant so polarisiert, dass eine sofortige Reoxidation des Proteins erfolgt und dieses nach der Reaktion mit dem Radikal sogleich wieder als Reaktionspartner zur Verfügung steht. Der dabei über die Elektrode fließende katalytische Strom ist proportional zur Konzentration des Radikals und kann somit als Sensorsignal verwendet werden.

Für *in vitro*-Experimente wird zur Radikalerzeugung fast ausschließlich das Enzym Xanthinoxidase (XOD) verwendet, welches bei Säugetieren an Purinabbauprozessen involviert ist. Es katalysiert in Gegenwart von Sauerstoff die Oxidation von Hypoxanthin (HX) oder Xanthin (X) zu Harnsäure und setzt als Nebenprodukte  $H_2O_2$  und Superoxid frei. Ein Zwei-Elektronenschritt führt von Sauerstoff direkt zum Wasserstoffperoxid, eine Ein-Elektronenreduktion hingegen setzt  $O_2^-$  frei.

Die Verwendung des Enzymsystem XOD-HX oder XOD-X hat für eine praktische Anwendung den Vorteil, dass der spontanen Dismutation des Radikals eine konstante Produktion durch das Enzym entgegensteht. Da Dismutation und Produktion gleich schnell ablaufen und sich ein *steady-state*-Zustand einstellt, werden dadurch über mehrere Minuten konstante Superoxidkonzentrationen erzielt. Bei der Verwendung von XOD zeigten Fridovich und Mitarbeiter, dass die stationäre Superoxidkonzentration sich proportional zur Wurzel der eingesetzten XOD-Aktivität einstellt (McCord und Fridovich 1968). Dies erlaubt eine mathematische Bestimmung der stationären Superoxidkonzentration und somit eine Kalibration des Sensorsystems. Unter geeigneten Bedingungen wie einem leicht alkalischen pH-Wert werden stationäre Superoxidkonzentrationen im Bereich von nM bis  $\mu$ M erzeugt.

Die weiteren Produkte der Enzymreaktion, Harnsäure und  $H_2O_2$ , können ein mögliches Hindernis der sensorischen Anwendung darstellen, da sie in einigen Potentialbereichen



direkt an der Elektrode umgesetzt werden und dadurch einen superoxid-unabhängigen Stromfluss hervorrufen, der das Messsignal verfälscht.

Zunächst war die Reaktion zwischen dem Radikal und Cyt.c im Multischichtarrangement prinzipiell zu zeigen. Danach waren die Empfindlichkeit zu bestimmen, mögliche Interferenzen zu untersuchen und die *in vitro*-Charakterisierung der Effektivität eines Modellantioxidans mit dem neuartigen Sensorsystem exemplarisch durchzuführen.

#### 4.1.4.1 Reaktion zwischen Superoxid und der Multischichtelektrode

Bei der Verwendung von Monoschichtelektroden in amperometrischen Messungen wurde ein konstantes Potential von 150 mV an die Elektrode angelegt (Cooper et al. 1993; Ignatov et al. 2002). Dies erlaubt die Reoxidation des Proteins, das an der Elektrode immobilisiert ein leicht negatives formales Potential besitzt. Da sich die Multischichtelektroden im formalen Potential von den Monoschichtsystemen nicht unterscheiden, wurde ein konstantes Potential von 150 mV gewählt. Im Vergleich zu anderen Sensorsystemen mit zum Teil deutlich höheren Potentialen, erfolgt hier eine Umsetzung von Harnsäure und  $\text{H}_2\text{O}_2$  erst bei deutlich höheren Konzentrationen, wodurch ein interferenzfreies Messen erleichtert werden sollte. Ein so erhaltenes Ergebnis einer 6-Schichtelektrode ist in Abb. 4.1.11 gezeigt.

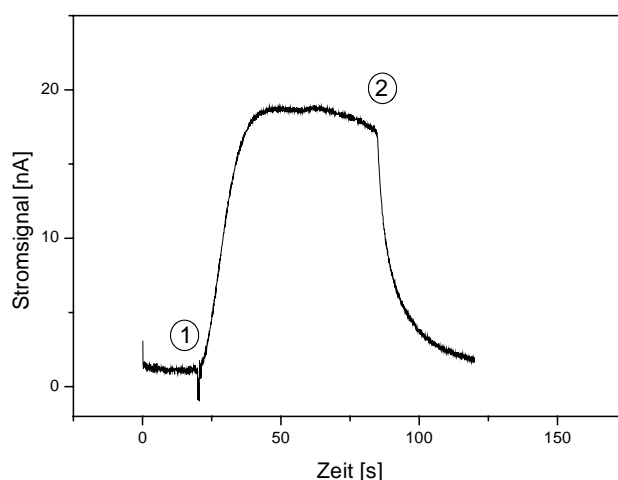


Abb. 4.1.11: Ansprechen der 6-Schicht-Elektrode auf das Superoxidradikal. 1: Beginn der Radikalgenerierung. 2: Entfernung des Radikals durch SOD-Zugabe (+150 mV, Puffer 3)

Vor Beginn der Radikalproduktion durch Zugabe des Enzyms wurde zunächst die Einstellung eines konstanten Hintergrundstroms in der Größenordnung weniger nA abgewartet. Die Zugabe des Enzyms in Gegenwart des Substrates HX in Lösung ließ die Stromstärke ansteigen. Innerhalb weniger Sekunden wurde ein maximales Plateau erreicht, das über einige Minuten stabil blieb. Eine Zugabe des Enzyms SOD in die Zelle nach Einstellung des Plateaus senkte das Signal innerhalb einiger Sekunden auf das Niveau des Hintergrundstromes vor Beginn der Superoxidgeneration.

Der Kurvenverlauf entspricht der früher beobachteten und erwarteten Entwicklung der Superoxidkonzentration in der Messzelle: Nach Zugabe des Enzyms entsteht sofort eine für Minuten stabile *steady-state*-Konzentration an Superoxid. Die Zugabe von SOD zersetzt sehr schnell und effektiv die Radikale in der Zelle und senkt somit die Superoxidkonzentration in der Messzelle effektiv auf Null. Das Ansprechen der Elektroden auf die Änderung der Radikalkonzentration verläuft ein wenig langsamer als bei Monoschichtelektroden beobachtet, was aber die Verwendungsmöglichkeiten des Sensors nicht einschränkt

Diese Ergebnisse zeigen die Reduktion des Proteins durch das Radikal und die Reoxidation von Cyt.c durch das Elektrodensystem. Sie demonstrieren die erfolgreiche Etablierung der Signalkette Superoxid-Cyt.c-Elektrode bei der Verwendung von Multischichtelektroden. Die Senkung des Stromsignals auf Hintergrundniveau durch Zugabe von SOD beweist, dass der Sensor nur auf das Superoxid reagiert und von den übrigen in der Lösung befindlichen Molekülen – XOD, HX, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Harnsäure – nicht beeinflusst wird. Damit ist die Verwendung der Multischichtanordnung als spezifischer Superoxidsensor prinzipiell möglich.

#### 4.1.4.2 Untersuchung der Sensitivität von Elektroden unterschiedlicher Schichtzahl

Bei einem Potential von +150 mV wurden amperometrische Messungen von Elektroden mit 2 bis 15 Schichten an Cyt.c aufgenommen und miteinander sowie mit den Ergebnissen einer Monoschichtelektrode verglichen.

Alle Multischichtsensoren übertrafen dabei die Monoschichtelektrode an Signalhöhe deutlich. Von zwei bis sechs Schichten erhöhte jeder zusätzlicher Depositionsschritt dabei spürbar die Empfindlichkeit in einer fast linearen Abhängigkeit. Die Deposition von mehr als 6 Schichten führte jedoch zu keinem weiteren Anstieg der Signalhöhe. Tatsächlich wurden mit 6-Schicht-Elektroden die höchsten Signale erzielt, während bei acht bis zwölf Schichten das Signal sogar etwas geringer ausfiel. Diese Ergebnisse sind in Abb. 4.1.12 dargestellt.

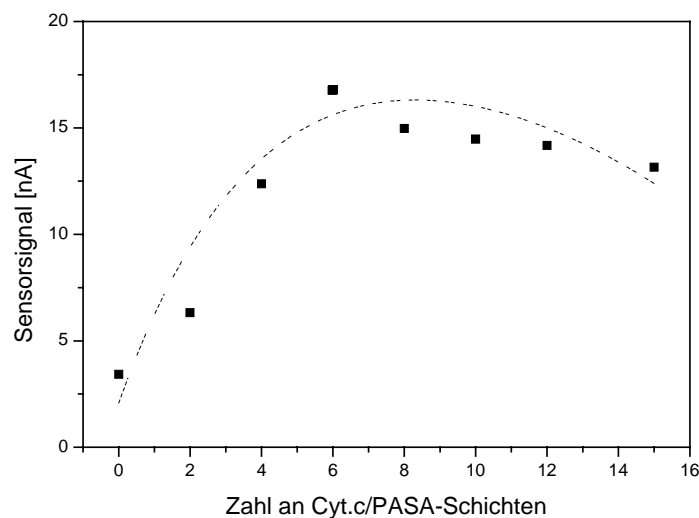
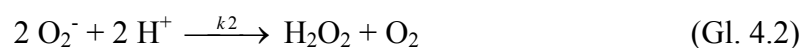


Abb. 4.1.12: Sensorsignal der Multischichtelektroden bei gleicher Superoxidkonzentration in Abhängigkeit der Zahl an Proteinschichten (0 = Monoschichtelektrode; 100  $\mu$ M Hypoxanthin, 20 mU/ml XOD, Puffer 3).

Somit lieferten die 6-Schichtelektroden die beste Empfindlichkeit gegenüber Superoxid und wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Diese Ergebnisse belegen das Konzept der Empfindlichkeitsverbesserung durch die Erhöhung der Proteinbeladung. Allerdings scheint ein Optimum bei 6 Schichten an Protein erreicht zu sein, ab dem offensichtlich ein immer größerer Teil der Cyt.c-Moleküle nicht mehr an der Reaktion mit dem Radikal teilnehmen kann. Dies legt nahe, dass auch die Zugänglichkeit der Proteinmoleküle für das Radikal in Lösung eine wichtige Rolle für die Sensitivität spielt und dies bei 8 und mehr Schichten nicht mehr optimal gewährleistet ist. Somit sind die 6-Schicht-Elektroden als der günstigste Kompromiss zwischen erhöhter Proteinbeladung und ausreichender Zugänglichkeit für das Radikal anzusehen.

Die Signalantwort des Sensorsystems wurde für verschiedene stationäre Superoxidkonzentrationen untersucht. Hierbei wurden in einer Messreihe bei konstanter Substratkonzentration unterschiedliche XOD-Aktivitäten verwendet. Aus diesen lässt sich die Superoxidkonzentration berechnen (Ge und Lisdat 2002). Beim Erreichen des stationären Superoxidkonzentrationsplateaus herrscht ein *steady-state* beruhend auf Dismutation und Produktion des Radikals, welches durch folgende Gleichungen beschrieben wird:



Nach Einstellung des *steady-state* verlaufen beide Reaktionen mit der gleichen Geschwindigkeit, also lässt sich nach Fridovich die Superoxidkonzentration anhand der Gleichung

$$[\text{O}_2^-] = \sqrt{\frac{k_1}{2k_2}} [\text{XOD}] \quad (\text{Gl. 4.3})$$

errechnen (McCord und Fridovich 1968). Die Konstante der Dismutation ist aus der Literatur zu entnehmen und beträgt  $2,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bei pH 7,5 (Behar et al. 1970). Die Geschwindigkeitskonstante der Superoxidproduktion wie bereits beschrieben (Ge und Lisdat 2002) unter den Bedingungen der Messung spektrometrisch als  $1,3 \text{ s}^{-1}$  ermittelt (A. Krylov, unveröffentlicht) und in Gleichung 4.3 eingesetzt.

Superoxidkonzentrationen zwischen 0,2 und 1,6  $\mu\text{M}$  wurden mit 6-Schichtelektroden gemessen. Das Elektrodensignal folgte den verschiedenen Konzentrationen und deren Unterdrückung durch SOD. Aus der Auftragung der Sensorantwort gegen die stationäre Superoxidkonzentration wurde die Empfindlichkeit des Sensors als  $0,398 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  bestimmt (s. Abb. 4.1.13). Dieser Wert ist um einen Faktor von etwa 12 höher als der Literaturwert einer Cyt.c-Monoschichtelektrode (Ge und Lisdat 2002).

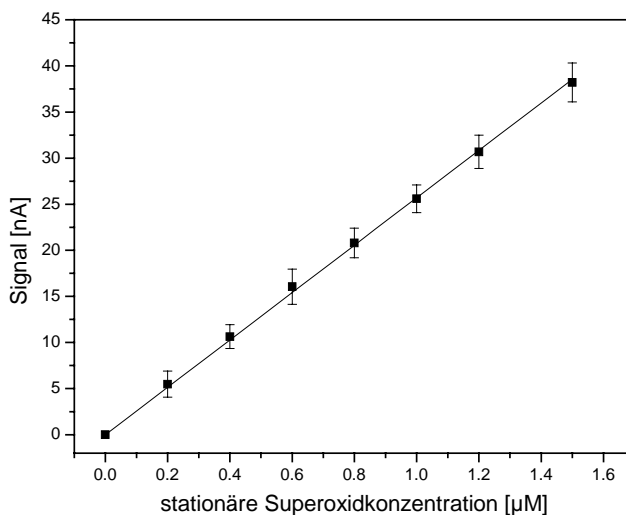


Abb. 4.1.13: Kalibration der 6-Schichtsensoren im Konzentrationsbereich zwischen 0,2 und 1,6  $\mu\text{M}$  Superoxid

Die Verwendung der Multischichtanordnung in der Superoxiddetektion führt also zu einer signifikanten Steigerung der Empfindlichkeit. Das Konzept der Erhöhung der Proteinbeladung auf der Elektrodenoberfläche zur Verbesserung der Sensitivität ist erfolgreich demonstriert.

Allerdings fällt dieser Empfindlichkeitsgewinn geringer aus als die Zunahme an elektroaktivem Protein, was wie besprochen auf die nicht vollkommene Zugänglichkeit der Gesamtheit aller Proteinmoleküle in Bezug auf das Radikal zurückzuführen ist. Dennoch bietet der signifikante Zuwachs an Sensitivität neue Möglichkeiten für die genaue Bestimmung von Superoxidkonzentrationen in Echtzeit.

#### 4.1.4.3 Untersuchung eines Modellantioxidans

Ascorbinsäure (Vitamin C) wird in der Antioxidantienbestimmung häufig als Standard eingesetzt und dient bei der Untersuchung neuer Substanzen meist als Vergleich. Gelegentlich werden sogar „Ascorbinsäure-Einheiten“ zum Vergleich verschiedener Antioxidantien definiert (Ignatov et al. 2002).

Deshalb wurde die Effektivität dieser Substanz gegenüber Superoxidradikalen mit der Multischichtelektrode untersucht. Hierbei wurden mehrere Aliquots im Verlaufe einer Superoxidmessung zugesetzt und die jeweilige Signalabnahme der zugesetzten Menge an Ascorbinsäure in der Messlösung korreliert. In Anlehnung an Toxizitätstests und Inhibitionsstudien wird die Konzentration, welche für eine 50%-ige Signalabnahme notwendig ist, als  $IC_{50}$  bezeichnet. Dieses Maß der Effektivität kann dann direkt mit den Werten anderer Antioxidantien verglichen werden.

Zugaben verschiedener Aliquots von Ascorbinsäure während der Messung resultierten wie erwartet in einer Senkung des Signals und einer darauf folgenden Einstellung eines neuen, niedrigeren Signalplateaus (siehe Abb. 4.1.14).

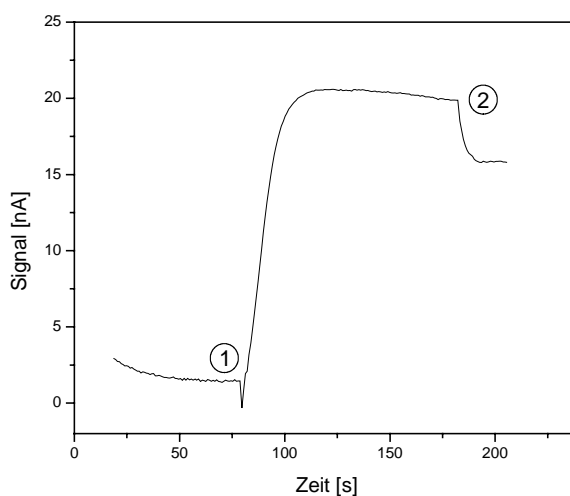


Abb. 4.1.14: Untersuchung des Radikalfängers Ascorbinsäure mit einer 6-Schichtelektrode (+150 mV, Puffer 3).  
1: Beginn der Radikalgenerierung. 2: Signalsenkung durch Zugabe von Ascorbinsäure

Eine graphische Auftragung der Signalsenkung gegen die Ascorbinsäurekonzentrationen in der Zelle ergab einen  $IC_{50}$  von  $2,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ , was genau dem mit Monoschichtelektroden

bestimmten Wert von  $2,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$  entspricht. Diese gute Übereinstimmung zeigt, dass mit der neuen Multischichtelektrode ermittelte Effektivitätsdaten von Antioxidantien mit den Werten früherer Messungen verglichen werden können und die Netzwerkarchitektur auch diese Bestimmungen nicht verfälscht.

#### 4.1.4.4 Stabilität der Multischichtsensoren

Wenige aufeinander folgende amperometrische Messrunden zeigten keine Veränderung des Superoxidsignals. Allerdings beruht der Strukturaufbau im Multischichtnetzwerk auf elektrostatischen Wechselwirkungen und ist daher weniger stabil als etwa kovalente oder chemisorptive Bindungen. Daher verursachte eine höhere Anzahl an Messungen oder eine längere Lagerung der Elektroden einen fortschreitenden Verlust an Protein. Eine Stabilisierung der Multischichtarchitektur war daher, insbesondere mit Hinblick auf die besonderen Belastungen einer *in vivo*-Anwendung, sehr wünschenswert.

Eine kovalente Verknüpfung durch Reagenzien wie EDC oder Glutaraldehyd konnte wegen der negativen Folgen für die Elektrochemie des Systems nicht vorgenommen werden.

Erfolg versprechend hingegen war ein anderer Ansatz. Mehrere Arbeitsgruppen berichteten von einem Einfluss der Temperatur auf die Struktur von Polyelektrolyt-Multischichten (Halthur et al. 2004; Steitz et al. 2002; Tan et al. 2003). Bei geeigneter Wahl der Parameter trat ein Prozess auf, der als „*annealing*“ bezeichnet wird und eine Verstärkung der Bindungskräfte zwischen den Polyelektrolytmolekülen bewirkt, die meist irreversibel ist.

Nach Aufbau der Multischichtelektroden wurden diese daher für einen Zeitraum von 15 bis 45 Minuten bei Temperaturen zwischen 35° und 60° Celsius in Puffer 2 erwärmt. Anschließend wurde ein Stresstest durchgeführt, bei dem 10 amperometrische Messungen bei einem Potential von 150 mV unter ständigem Rühren und einer Messdauer von 90 Sekunden durchgeführt wurden. Nach jeder Messung wurde ein zyklisches Voltammogramm aufgenommen und die Beladung mit elektroaktivem Protein ermittelt.

Während eine unbehandelte Elektrode schnell eine irreversible Abnahme der Proteinbeladung aufwies, zeigten die temperaturbehandelten Elektroden eine erhöhte Stabilität. Beste Ergebnisse wurden durch eine 30-minütige Inkubation bei 45° C erreicht. Hier wurde selbst nach 10 amperometrischen Messrunden keine Abnahme der Menge an

elektroaktivem Protein auf der Elektrode festgestellt. Abb. 4.1.15 stellt die Stabilität einer solchen Elektrode der einer unbehandelten Elektrode prozentual gegenüber.

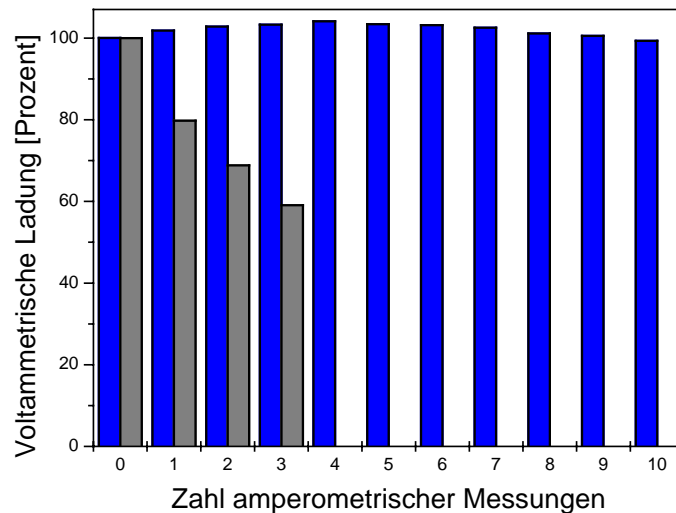


Abb. 4.1.15: Veränderung der voltammetrischen Ladung von 6-Schichtelektroden nach aufeinander folgenden amperometrischen Messungen.  
Blau: Temperaturbehandelte Elektrode. Grau: Unbehandelte Elektrode

Erhöhte Temperaturen führen in der Proteinchemie in der Regel zu einer Abnahme an Stabilität, da durch die Erwärmung ein Beginn der Proteinentfaltung herbeigeführt wird. Dies ist bei den Cyt.c-Multischichtelektroden bei Erwärmungen über 65° C auch zu beobachten. Die Inkubation bei 45° C hingegen scheint hauptsächlich auf den Polyelektrolyten PASA zu wirken. Die Stabilität der Bindung zwischen PASA und Protein wird verstärkt, da auf Grund der zugeführten Energie der Polyelektrolyt vermutlich flexibler wird und somit zusätzliche Bindungsstellen an das Protein herangeführt werden. Außerdem ist in der Literatur eine Absenkung des Wassergehaltes im Multischichtnetzwerk beschrieben, die Polyelektrolyt und Protein näher aneinander bringt und somit ebenfalls die Interaktionen zwischen beiden verstärkt.



#### 4.1.4.5 Einfluss von Interferenzen

Als Nebenprodukte der radikalgenerierenden XOD-Reaktion entstehen Harnsäure und  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Diese Stoffe können ebenso wie das untersuchte Antioxidans Ascorbinsäure elektrochemisch umgesetzt werden, was während der Radikalbestimmung Superoxid-unabhängige Veränderungen des Stromflusses und somit eine Verfälschung des Sensorsignals bewirken könnte. Um diesen Einfluss aufzuklären, wurden amperometrische Messungen durchgeführt, bei denen eine 6-Schichtelektrode auf +150 mV in Puffer 3 polarisiert und in Abwesenheit von Superoxid der Stromfluss gemessen wurde. Es wurden mehrfach Aliquots der 3 potentiellen Störsubstanzen zugegeben, bis eine Änderung des Stromsignals auftrat.

$\text{H}_2\text{O}_2$  kann im relevanten Potentialbereich elektrochemisch umgesetzt werden. Es wird vielfach in Biosensoren der zweiten Generation genutzt, bei denen das immobilisierte Enzym einen Analyten umsetzt und dabei  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Nebenprodukt der Reaktion freigesetzt wird. Dies kann auf Grund der Reaktionsstöchiometrie als Signal verwendet und in Analytkonzentrationen umgerechnet werden.

In einem Biosensor der dritten Generation mit direktem Elektronentransfer zwischen Protein und Elektrode, wie dem hier vorliegenden Multischichtsystem, kann allerdings ein direkter Umsatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  an der Elektrodenoberfläche zu Verfälschungen des Sensorsignals führen. Auch ist für Cyt.c eine Pseudo-Peroxidaseaktivität beschrieben (Kim et al. 2004), die zu einer Elektronentransferkette  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Cyt.c-Elektrode führen und auf diesem Weg ebenfalls die Stromantwort des Sensors verfälschen kann.

Das Antioxidans Ascorbinsäure kann ebenfalls an entsprechend polarisierten Elektroden Redoxreaktionen durchlaufen und dadurch die Untersuchung der Radikalabfangfähigkeiten dieser Modellsubstanz stören.

Harnsäurekonzentrationen unter 2 mM zeigten keinen Einfluss auf das amperometrische Signal. Die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Aliquots führte unterhalb einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  zu keiner Veränderung des Stromsignals. Bei Ascorbinsäurekonzentrationen unter 150  $\mu\text{M}$  war auch hier keine Beeinflussung des Sensorsignals festzustellen, ab dieser Schwelle traten Verschiebungen der Messkurve in positiver Richtung auf.

Da unter den Bedingungen der *ex vivo*-Superoxidgenerierung auf Grund der Stöchiometrie nur maximal 100  $\mu\text{M}$  Harnsäure entstehen, können Störungen des Sensorsignals durch Harnsäure ausgeschlossen werden. Auch im menschlichen Serum werden maximal 350  $\mu\text{M}$  Harnsäure erreicht (Lentner 1984). Somit wird in beiden Fällen der kritische Schwellenwert von 2 mM nicht annähernd erreicht.

Der Schwellenwert von Ascorbinsäure entspricht in etwa dem 70-fachen des ermittelten  $\text{IC}_{50}$  und verfälscht somit nicht die Bestimmung der antioxidativen Effektivität durch den direkten Umsatz an der Elektrode. Auch *in vivo* sind derartig hohe Konzentrationen nicht zu erwarten. Im humanen Serum werden maximale Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  nicht überschritten (Lentner 1984).

Eine Interferenz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann ebenfalls ausgeschlossen werden. Im Serum von Säugetieren sind derart hohe Konzentrationen nicht zu erwarten, da im Zellkulturversuch bereits 125  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  für die Zellen letal war (Spector et al. 2000). Bei *in vitro*-Experimenten wird deutlich weniger als 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  freigesetzt.

Somit ist auch in Gegenwart der signalstörenden Substanzen eine quantitative Superoxidbestimmung und die Untersuchung antioxidativer Effizienz möglich, ohne Korrekturen wegen der auftretenden Reaktionsprodukte oder Antioxidantien vornehmen zu müssen.

Die temperaturbehandelten Multischicht-Elektroden weisen somit eine für praktische Anwendungen *in vitro* ausreichende Stabilität, Selektivität und Empfindlichkeit auf. Auch für *in vivo*-Untersuchungen bieten sich die neuartigen Elektroden an. Zu diesem Zwecke wurden im Februar 2005 entsprechende Elektroden an den Kooperationspartner in der Charité zu Berlin übergeben, der erste Erprobungen der neuen Sensoren zum Zeitpunkt der Niederschrift dieser Arbeit durchführt.

## 4.2 Superoxidsensoren mit Mutanten der humanen Cu,Zn-Superoxiddismutase

Ziel dieses Teils der Arbeit war, Mutanten der humanen Cu,Zn-SOD zu entwerfen, zu exprimieren, aufzureinigen und elektrochemisch zu charakterisieren. Anschließend war der Einsatz als spezifische elektrochemische Superoxidsensoren zu untersuchen.

Die Mutanten sollten einen oder zwei Cystein-Reste anstelle von im Wildtyp vorhandenen Aminosäuren enthalten, um mit diesen direkt auf die Goldoberfläche der Elektroden zu binden. Dies bietet die Vorteile einer definierten Orientierung des Proteins zur Elektrode und einer geringen Distanz zwischen dem aktiven Zentrum des Enzyms und der Elektrodenoberfläche. Eine unspezifische Adsorption, wie sonst häufig bei direktem Kontakt zwischen Proteinen und Metalloberflächen beobachtet, sollte damit vermieden werden.

Zunächst waren Aminosäuren für die Mutationen auszuwählen, um eine möglichst günstige Ausrichtung des aktiven Zentrums zur Elektrode zu erreichen, ohne die Aktivität des Enzyms zu beeinträchtigen. Danach war die Expression und Aufreinigung der Mutanten durchzuführen. Nach der Herstellung einer ausreichenden Menge an Protein war dessen Bindung an Goldoberflächen zu charakterisieren und dies zum Aufbau von Proteinelektroden zu nutzen. Dabei galt es, die elektrochemischen Parameter der Elektroden zu untersuchen und ihre Interaktion mit dem Superoxidradikal zu erforschen, um sie schließlich als Superoxidsensoren einzusetzen. Eine Besonderheit der Superoxiddismutase ist, dass sie das Radikal sowohl oxidieren als auch reduzieren kann, so dass beide Teilreaktionen separat zur Superoxiddetektion genutzt werden sollten.

#### 4.2.1 Das Protein M2E133QSOD als Ausgangspunkt für Mutationsstudien

Bisherige SOD-Elektroden wurden hauptsächlich durch Verwendung von kurzkettigen Promotoren, wie Cystein oder Mercaptopropionsäure, erzeugt (Ge et al. 2003; Tian et al. 2002b). Diese Promotoren zeigten allerdings im sensorisch bedeutsamen Potentialbereich zwischen -100 und +250 mV in zykovoltammetrischen Studien eigene Strompeaks (Fei et al. 2005; Forlano et al. 1997; Petri et al. 2003), die möglicherweise die Untersuchung des Elektronentransfers zwischen SOD und Elektrode beeinflussen können.

Proteinelektroden, bei denen das Enzym direkt über eine schwefelhaltige Aminosäure an die Goldoberfläche binden, kommen zusätzlich zu den oben genannten Vorteilen ohne den Gebrauch von Promotoren aus. Somit wird neben der geringeren Distanz zwischen Elektrodenoberfläche und Protein auch eine Verdünnung der Schwefelgruppen auf der Oberfläche erreicht.

Eine erfolgreiche Immobilisierung von Cystein-haltigen Proteinen durch direkte Bindung des Cystein-Schwefels an Goldoberflächen wurde in einigen Arbeiten bereits beschrieben (Carmon et al. 2004; Di Felice und Selloni 2004; Ferapontova et al. 2002; Wang und Wang 2004).

Eine weitere Herausforderung bei der elektrochemischen Untersuchung von Cu,Zn-SOD ist die Tatsache, dass dieses Enzym sehr häufig als Homodimer auftritt. Bei der Immobilisierung eines Dimers für elektrochemische Studien bleibt oftmals die Frage offen, ob tatsächlich beide aktiven Zentren mit der Elektrode kommunizieren, oder ob dies nur für eine Untereinheit der Fall ist (schematisch in Abb. 4.2.1 gezeigt). Gerade für Enzyme mit hoher Umsatzrate wie die SOD ist dies problematisch, da dann die mit der Elektrode nicht kommunizierende Untereinheit Superoxidradikale in der Lösung zersetzt und somit die Konzentration des Analyten zusätzlich senkt, ohne dass dadurch ein Sensorsignal generiert würde.

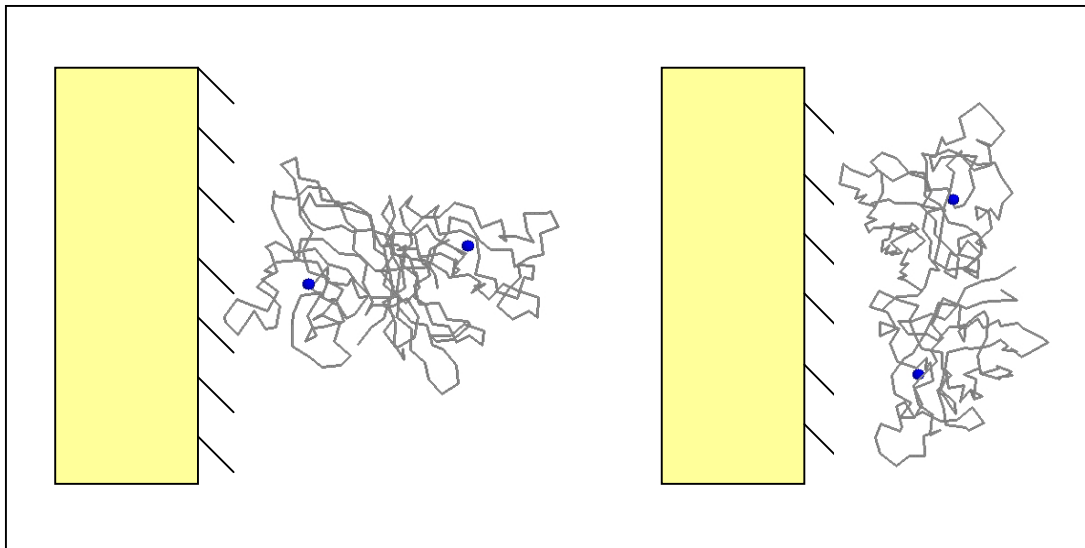


Abb. 4.2.1: Schematische Darstellung der möglichen Anordnung von dimeren Proteinen (hier bovine Cu,Zn-SOD) auf der Elektrodenoberfläche. Links: nur ein aktives Zentrum ansprechbar. Rechts: beide aktiven Zentren ansprechbar.

Ausgangspunkt des Entwurfs der hier vorgestellten Mutanten war das Protein M2E133QSOD (siehe Literaturübersicht). Dies ist eine in Florenz von der Arbeitsgruppe Prof. Ivano Bertini gentechnisch erstellte Mutante der dimeren humanen Cu,Zn-SOD, bei der durch Austausch zweier Aminosäuren die Dimerisierungsregion nicht funktionsfähig ist. Somit kann M2E133QSOD als monomeres Protein stabil exprimiert und in aktiver Form isoliert werden (Bertini et al. 1998). Die Verwendung einer monomeren SOD vermeidet das im vorigen Absatz geschilderte Problem bei der Untersuchung eines dimeren Proteins.

Obwohl M2E133QSOD die rekombinante monomere Version eines humanen dimeren Proteins ist und die oben angeführten Mutationen erhält, wird es im folgenden als „Wildtyp“ bezeichnet, da es Ausgangspunkt der Cystein-Mutationsansätze ist und in Bindungsstudien als Vergleich für die neugewonnenen Mutanten dient.

#### 4.2.2 Entwurf der Mutationen

Die Auswahl der Mutationsstellen und die Expression und Aufreinigung der Mutanten wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Maria Silvia Viezzoli von der Università di Scienze in Florenz, Italien durchgeführt.

Für die Erstellung möglicher SOD-Mutanten wurden Aminosäuren nach drei Kriterien ausgewählt: Sie mussten in der Nähe des Substrateingangskanals des aktiven Zentrums liegen, um dieses möglichst nahe an die Elektrodenoberfläche zu orientieren. Gleichzeitig durften weder dieser Kanal noch die unmittelbare Umgebung des aktiven Zentrums durch eine Ladungsveränderung oder strukturelle Umgestaltungen verändert werden, um die korrekte Substratbindung und die Aktivität des Enzyms nicht zu gefährden. Schließlich war auch ein zu großer Einfluss auf die Sekundärstruktur des Proteins insgesamt zu vermeiden, um die Enzymaktivität beizubehalten und keine Aggregation der Proteinmoleküle in Lösung hervorzurufen.

Mehrere potentielle Mutationen wurden von Frau Dr. Viezzoli mit der Software Prosa II untersucht. Hierbei wurde der Einfluss der Mutanten auf das Energieniveau in der Proteinstruktur bestimmt, indem in die bekannte Struktur des Wildtyps an den ausgewählten Positionen Cystein anstelle der im Wildtyp vorhandenen Aminosäuren eingesetzt wurde. Eine deutliche Verschiebung des Energieniveaus im Vergleich zum Wildtyp deutete auf eine Veränderung der Sekundärstruktur im Enzym hin und legte somit einen negativen Einfluss der Mutation auf Stabilität und Aktivität der SOD nahe.

Aus diesen Simulationen wurden schließlich 5 potentielle Mutationspositionen ermittelt, bei denen ein Austausch der jeweiligen Aminosäure gegen Cystein zu keinen großen strukturellen Veränderungen führen dürfte. Diese sind Alanin 60, Glycin 61, Serin 68, Glycin 141 und Serin 142. Abb. 4.2.2 zeigt die dreidimensionale Struktur des Wildtyps mit Blick auf das Kupfer im aktiven Zentrum und die ausgewählten Aminosäuren.

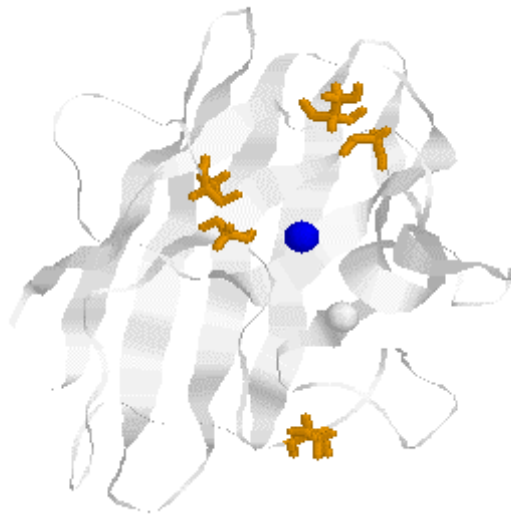


Abb. 4.2.2: Strukturmodell der monomeren humanen Cu,Zn-SOD mit Blick auf das Kupfer des aktiven Zentrums (blau). Die zur Mutation ausgewählten Aminosäuren sind in Orange als „Sticks“ dargestellt. (Quelle: 1DSW in der *Brookhaven Protein Databank*)

Für die Proteingewinnung wurden 6 Plasmide erstellt, von denen 3 die genetische Information für Einzelmutanten (ein zusätzlicher Cystein-Rest) und 3 ein Gen von Doppelmutanten (2 zusätzliche Cysteine) trugen. Tabelle 4.2.1 fasst die Mutationen zusammen und vereinfacht die weitere Beschreibung durch Einführung einer Namensgebung.

Mutationen	Zahl der Cys-Reste	Benennung
Alanin60→Cystein	1	Mut1A
Serin68→Cystein	1	Mut1B
Serin142→Cystein	1	Mut1C
Glycin61/Glycin141→Cystein	2	Mut2A
Glycin61/Serin142→Cystein	2	Mut2B
Alanin60/Serin142→Cystein	2	Mut2C

Tabelle 4.2.1: Auflistung der ausgewählten Mutationen und Benennung der Mutanten

### 4.2.3 Herstellung und Aufreinigung der SOD-Mutanten

Die Gewinnung von Plasmiden, welche die mutierten SOD-Gene enthielten, erfolgte durch Einsatz eines kommerziellen Mutagenese-Kits. Eine Sequenzierung der Plasmide durch einen externen Dienstleister verifizierte die gewünschten Veränderungen der Basenfolge. Agarose-Gele zeigten die erfolgreiche Gewinnung einer ausreichenden Menge an Plasmiden.

Mit diesen Plasmiden wurden *E. coli*-Bakterien vom Stamm TOPP1 nach dem Hitzeschockprotokoll transformiert.

Durch Zugabe des Inducers IPTG zu den transformierten Bakterien wurde die Expression der SOD, die unter Kontrolle des durch IPTG-induzierbaren Promotors des *lac/UV5tac*-Gens steht, gestartet.

Nach Erreichen einer ausreichenden Dichte der Kulturen wurden diese mit einem osmotischen Schock bei 4°C behandelt und die periplasmatischen Bestandteile, unter denen sich die SOD befindet, von der übrigen Zellsubstanz getrennt.

Abb. 4.2.3(A) zeigt ein SDS-Page-Gel der Gesamtheit aller so gewonnenen Proteine für Mutante Mut2A. Die Dominanz der SOD-Bande in allen Fraktionen zeigt, in welchem Überschuss das Enzym im Vergleich zu den übrigen periplasmatischen Proteinen vorliegt.



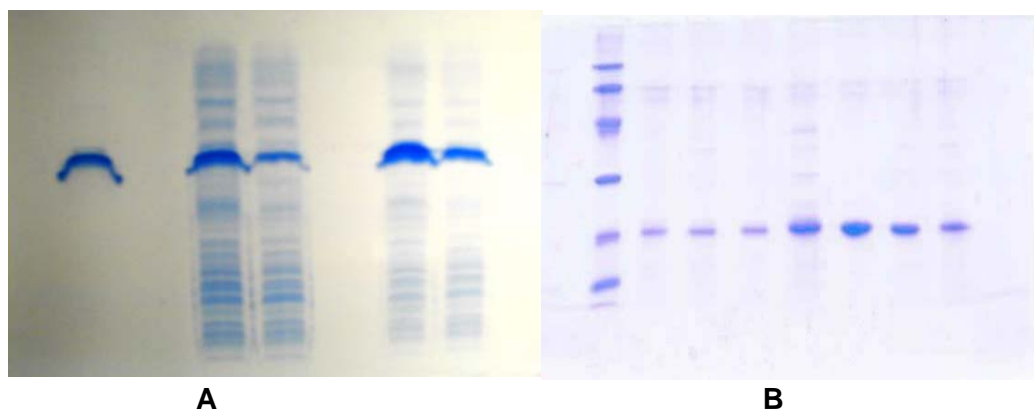


Abb. 4.2.3: SDS-Page-Gele verschiedener Proteinaufreinigungsschritte. **A**: von links: gereinigter Wt als Marker, 4 Präparationen der gewonnen periplasmatischen Proteine. **B**: von links: Größenstandard (von unten: 14,4; 20,1; 30; 43; 67; 94 kDa), aufgereinigte Präparation von Mut1A, Mut2A, Mut2B, Mut2C, Wt, Mut1B, Mut1C.

Diese Präparationen wurden auf einer Sephadexsäule chromatographisch aufgetrennt und die SOD-haltigen Fraktionen durch SDS-Page-Gelelektrophorese identifiziert und vereinigt. Nach Reduzierung des Volumens wurde den Lösungen noch 5mM DTT zugesetzt, um eine Dimerisierung der Proteine über die Bildung von Schwefelbrücken der eingefügten Cystein-Reste zu vermeiden.

Ein SDS-Page-Gel dieser Stammlösungen aller Mutanten ist in Abb. 4.2.3(B) dargestellt. Auch wenn noch einige Verunreinigungen im Bereich über 50 kDa vorliegen, ist die Reinheit dieser Lösungen für die weiteren Untersuchungen der SOD-Mutanten als ausreichend zu betrachten.

Spektroskopische Untersuchungen ergaben, dass mehr als 100 mg Protein von jeder Mutante für die elektrochemischen Studien zur Verfügung stand.

Die Aktivität der aufgereinigten Mutanten wurde in einem amperometrischen Messansatz unter Verwendung der Multischichtelektroden verifiziert. Hierbei senkte die Zugabe der SOD-Mutanten das Superoxidsignal des Sensors auf Null.

#### 4.2.4 Erzeugung und elektrochemische Charakterisierung von SOD-Elektroden

Die Bindung der SOD-Mutanten an Gold sollte auf der Wechselwirkung zwischen der Oberfläche und dem Schwefel des Cysteins beruhen. Daher wurden Golddrahtelektroden

in 100  $\mu\text{M}$  Lösungen der Mutanten in Puffer 4 über Nacht inkubiert. Dabei blieben die Inkubationsansätze für die Luft zugänglich, um somit eine langsame Zersetzung des DTT in der Lösung zu erreichen, wie in der Literatur beschrieben (Cornell und Crivaro 1972; Olsen und Davis 1976). Anschließend wurden zyklische Voltammogramme der so erzeugten Proteinelektroden aufgenommen.

Zyklische Voltammogramme dieser Elektroden zeigt Abb. 4.2.4.

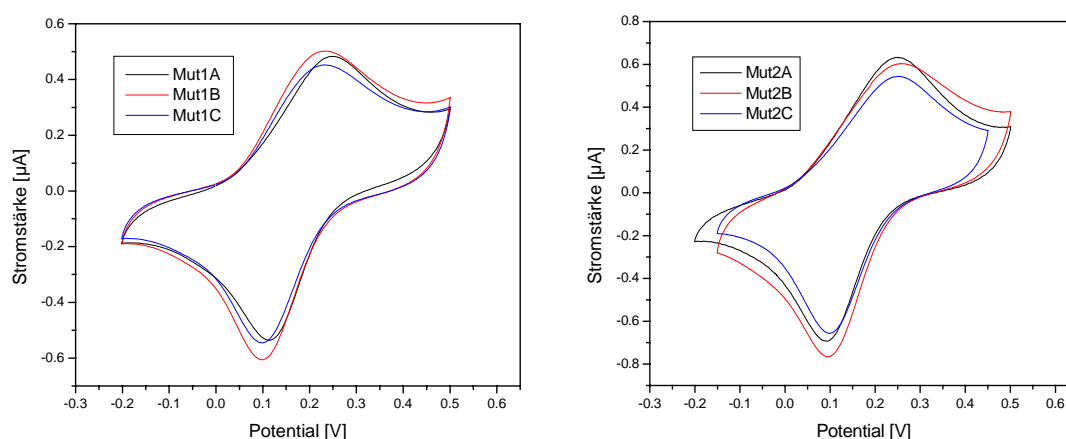


Abb. 4.2.4: Zyklische Voltammogramme der SOD-Mutanten.

Links: Einzelmутanten (1 Cys-Rest), rechts: Doppelmутanten (2 Cys-Reste).

In Puffer 4, Scanrate 100 mV/Ss

Alle Mutanten-modifizierten Elektroden zeigten ein elektrochemisches Ansprechen mit ausgeprägten Redoxpeaks.

Um sicherzustellen, dass diese Peaks tatsächlich auf einen Elektronentransfer zwischen Elektrode und dem aktiven Zentrum der Mutanten zurückzuführen sind, und nicht etwa auf ein Ansprechen der Cysteinreste selbst, wurden Elektroden mit kupferfreien Apo-Formen von Mut1C und Mut2A hergestellt. Apo-SOD kann durch Inkubation mit dem Komplexbildner EDTA im Vergleich zu Apo-Cyt.c schonend und mit geringem Aufwand hergestellt werden. Die Abwesenheit des Kupfers führt zu keinen gravierenden strukturellen Änderungen des Enzyms (Banci et al. 2002).

Ein SDS-Page-Gel zeigte eine durchgehende Bande für Apo-Mutante1C in der korrekten Position der monomeren SOD (s. Abb. 4.2.5). Dies belegt, dass die Behandlung mit EDTA die Integrität des Proteins nicht zerstört.

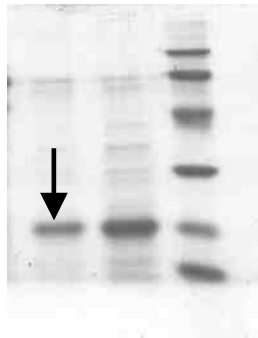


Abb. 4.2.5: Ausschnitt eines SDS-Page-Gels von Apo-Mut1C (mit Pfeil hervorgehoben). Rechts aussen: Größenstandard (von unten: 14,4; 20,1; 30; 43; 67; 94 kDa).

Die erfolgreiche Bindung der Apo-Mutante an das Gold wurde durch SPR-Spektroskopie (s. Abb. 4.2.6) und Impedanzspektroskopie (Abb. 4.2.7) verifiziert. Im Sensogramm zeigten Mut1C und Apo-Mut1C über einen Zeitraum von 3h einen sehr ähnlichen Anstieg und nach Pufferspülung eine deutliche Erhöhung der an der Oberfläche gebundenen Masse im Vergleich zum Ausgangswert.

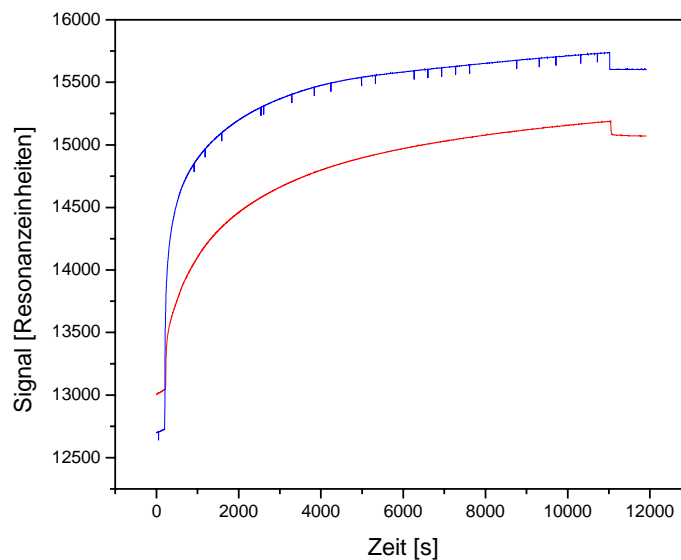


Abb. 4.2.6: Sensogramm der Immobilisierung von Mut1C (blau) und Apo-Mut1C (rot) auf der Goldoberfläche eines SPR-Chips.

In der Impedanzspektroskopie zeigten sowohl Apo- als auch Holoenzym (Mut1C) eine ähnliche Bedeckung der Oberfläche und einen deutlichen Unterschied zur proteinfreien Elektrode (s. Abb. 4.2.7).

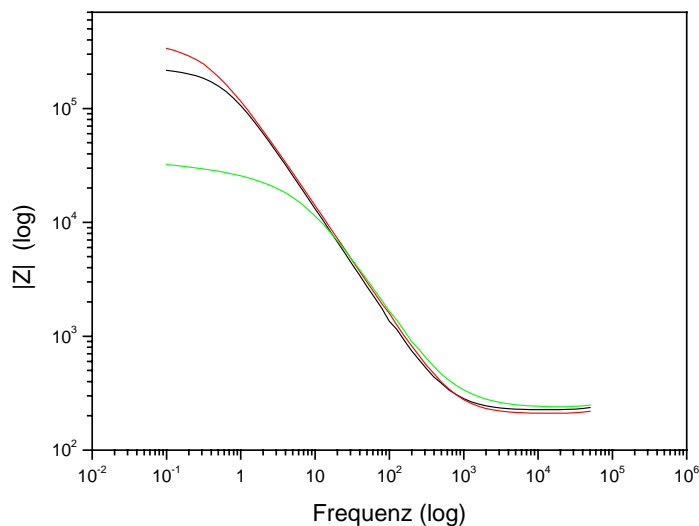


Abb. 4.2.7: Teil des Bode-Plots der Impedanzspektroskopie von Elektroden beschichtet mit Mut1C (schwarz) und Apo-Mut1C (rot) und einer unmodifizierten Goldelektrode (grün). Phasengang aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen.

Somit verifizierten beide Verfahren, dass Apo-Mut1C in gleicher Weise und ähnlicher Menge wie das kupferhaltige Enzym an der Goldelektrode immobilisiert wurde.

Als zusätzliches Kontrollexperiment wurden Elektroden in gleicher Weise mit einer Lösung des Wildtyps behandelt, um zu überprüfen, ob die Elektrochemie der Mutantenelektroden auf der Bindung der Mutanten über den Cystein-Schwefel auf der Goldoberfläche beruht.

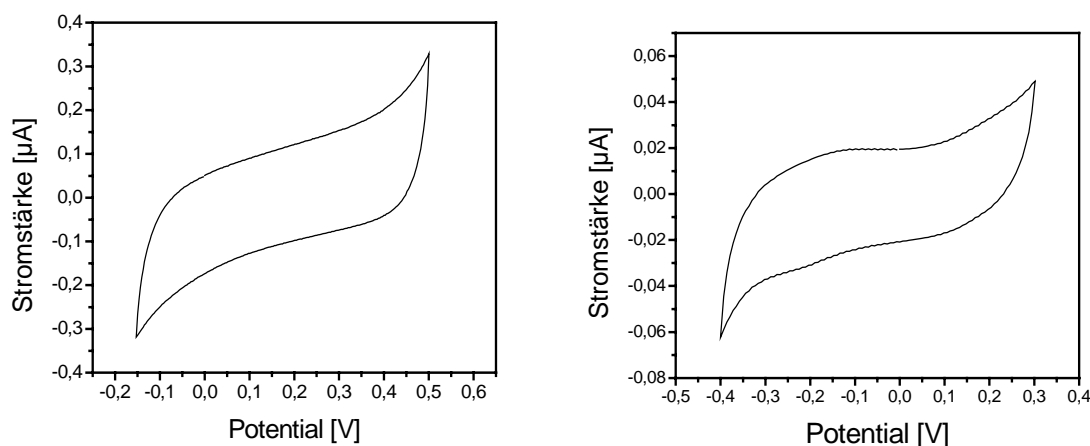


Abb. 4.2.8: Zyklische Voltammogramme von Apo-Mut1C (link) und Wt (rechts) nach Inkubation auf einer unmodifizierten Goldelektrode (Scanrate 100 mV/s, Puffer 4).

Im Zyklovoltammogramm zeigten mit Apo-Mut1C bzw. Apo-Mut2A behandelte Goldelektroden ebenso wie der nach gleichem Verfahren mit einer unmodifizierten Elektrode inkubierte Wildtyp keine Redoxpeaks (siehe Abb. 4.2.8).

Die Ergebnisse der Apo-Mutanten belegen eindeutig, dass die für die kupferhaltigen Mutanten gefundenen voltammetrischen Signale auf das Kupfer im aktiven Zentrum zurückzuführen sind, und nicht auf eventuelle Elektronentransferreaktionen des Cysteins, wie für Cystein-Promotoren in der Literatur beschrieben wurde.

Der Wildtyp der SOD ohne eingefügte Cysteine kann ebenfalls keinen reversiblen Elektronentransfer zwischen aktivem Zentrum und Elektrode gewährleisten. Dies zeigt die Notwendigkeit der Cystein-Reste zur funktionellen Immobilisierung der Mutanten auf der Elektrode.

Durch diese Kontrollexperimente wurde nachgewiesen, dass die erstellten SOD-Mutanten über die eingefügten Cysteine auf der Goldoberfläche immobilisiert werden und mit den Elektroden über das aktive Zentrum des Enzyms elektrochemisch kommunizieren können.

#### 4.2.4.1 Elektrochemische Charakterisierung der SOD- Mutanten

Für alle Mutanten wurden nach der Immobilisation auf Goldelektroden in Puffer 4 das formale Potential und die heterogene Elektronentransfergeschwindigkeitskonstante  $k_s$  nach der Vorgehensweise von Laviron (Laviron 1978) bestimmt. Alle Mutanten folgten dabei dem darin beschriebenen Modell, wonach  $k_s$  in Abhängigkeit von der Scanrate einen hyperbolischen Verlauf nimmt. Für alle Mutanten wurde ein  $\alpha$ -Wert von 0,5 ermittelt. Ein Beispiel einer solchen Bestimmung für Mut1A ist in Abb. 4.2.9 gezeigt.

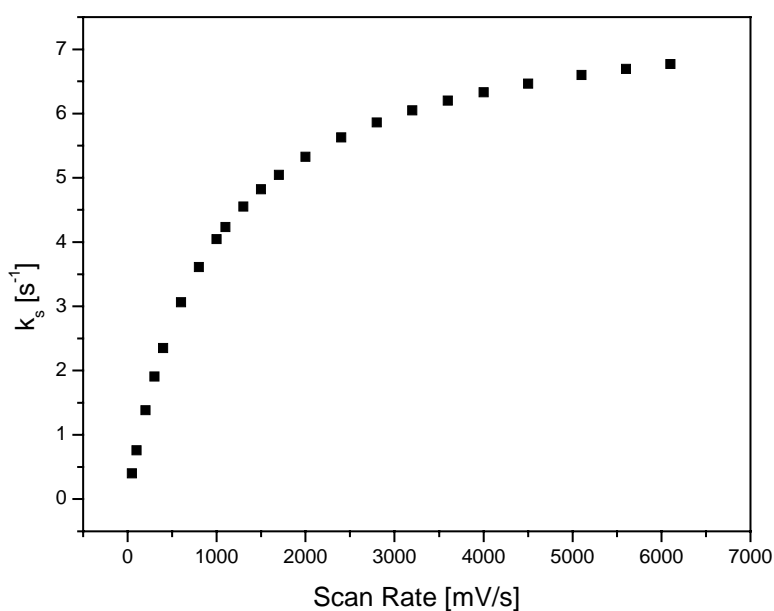


Abb. 4.2.9:  $k_s$ -Bestimmung für Mut1A nach Laviron durch Auftragung der ermittelten  $k_s$ -Werte gegen die Scanrate.

Tabelle 4.2.2 fasst die bestimmten Parameter zusammen.

Mutante	$E^0$ [mV] (vs. Ag/AgCl/1M KCl; n = 6)	$k_s$ [ $s^{-1}$ ] (n = 4)
Mut1A	$158 \pm 5$	$7,8 \pm 1,7$
Mut1B	$146 \pm 9$	$9,4 \pm 1,5$
Mut1C	$146 \pm 6$	$6,4 \pm 2,7$
Mut2A	$154 \pm 6$	$7,3 \pm 2,1$
Mut2B	$149 \pm 4$	$10,5 \pm 4,1$
Mut2C	$151 \pm 3$	$5,8 \pm 1,3$

Tabelle 4.2.2: formales Potential und Geschwindigkeitskonstante des heterogene Elektronentransfers der SOD-Elektroden.

Das formale Potential sämtlicher Mutanten wurde in einer pH-Reihe zwischen pH 9 und pH 5 untersucht. In allen Fällen sank das Potential linear mit steigendem pH-Wert mit einer Steigung von  $-18$  mV pro pH-Einheit. Diese niedrige Steigung weist auf eine partielle Änderung der Protonierung des Aminosäuregerüsts bei unterschiedlichen pH-Werten hin.

Aus den Peakflächen der zyklischen Voltammogramme wurde für alle Mutanten ein elektroaktive Oberflächenbelegung von  $28 \pm 6$  pmol  $cm^{-2}$  errechnet (Mittelwert aus jeweils 6 Elektroden).

#### 4.2.4.2 Elektrochemische Untersuchung des Wildtyps

Um den Einfluss der Immobilisierung über die eingefügten Cysteinreste auf die Elektrochemie der SOD zu untersuchen, wurde der Wildtyp an herkömmlichen promotor-modifizierten Elektroden immobilisiert. Hierbei wurde eine Goldelektrode zunächst über Nacht mit Mercaptopropionsäure (MPA) behandelt und anschließend für 24h in einer 100  $\mu$ M Lösung des Wildtyps in Puffer 4 inkubiert. Im zyklischen Voltammogramm zeigten sich ausgeprägte Oxidations- und Reduktionspeaks, wie in Abb. 4.2.10 ersichtlich.

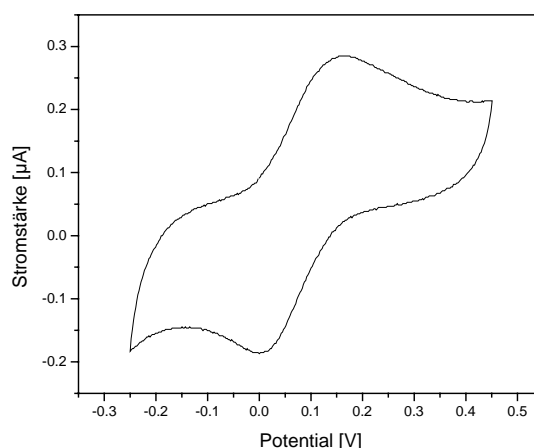


Abb. 4.2.10: Zyklovoltammogramm des Wildtyps adsorbiert an eine MPA-modifizierte Goldelektrode.

Das formale Potential dieser Wt-Elektrode betrug  $94 \pm 5$  mV. In einer Scanratenvariation gehorchten auch die Wt-MPA-Elektroden dem Modell von Laviron (Laviron 1978), nach welchem ein  $k_s$ -Wert von  $6,4 \pm 0,8$  s<sup>-1</sup> ermittelt wurde (jeweils Mittelwert aus 3 Elektroden).

#### 4.2.4.3 Mut1C auf einer MPA-modifizierten Elektrode

Die SOD-Mutanten können auch an eine promotor-modifizierte Goldelektrode gebunden werden, wobei dann dem Cysteinrest keine Funktion zukommt, sondern die Adsorption durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Promotor und Protein erfolgt.

Um das Verhalten derartiger Elektroden mit den direkt an Gold chemisorbierten Mutanten vergleichen zu können, wurden mit MPA beschichtete Goldelektroden in einer Mut1A-Lösung inkubiert und anschließend zyklometrisch untersucht. Auch diese Elektroden zeigten ein elektrochemisches Ansprechen der SOD mit einem formalen Potential von  $116 \pm 8$  mV und einen  $k_s$  von  $4,8 \pm 2,2$  s<sup>-1</sup> (Mittelwert von 3 Elektroden).



## Diskussion

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen die erfolgreiche Immobilisation der SOD-Mutanten über den Schwefel der gentechnisch eingefügten Cysteinreste. Nach der Immobilisation wurde ein quasi-reversibler Elektronentransfer zwischen dem Kupfer im aktiven Zentrum und der Elektrode festgestellt.

Weder im formalen Potential noch im  $k_s$ -Wert unterscheiden sich die Mutanten deutlich voneinander. Dies legt den Schluss nahe, dass keine der Mutationen die Elektrochemie des aktiven Zentrums stark beeinflusst, sondern offensichtlich die Umgebung des Kupfers bei allen Mutanten in einem sehr ähnlichen Zustand vorliegt. Die ausgewählten Mutationspositionen orientieren also das aktive Zentrum in sehr ähnlicher Weise nahe der Elektrodenoberfläche, ohne die unmittelbare Umgebung des Kupfers auf unterschiedliche Weise zu verändern. Dies lässt auf den Erhalt der Enzymaktivität auch im immobilisierten Zustand schließen.

Das formale Potential der SOD-Mutanten liegt um etwa 60 mV über dem des Wildtyps an einer MPA-Elektrode und etwa 35 mV über dem von Mut1A an Gold-MPA. Offensichtlich verändert also die Bindung über die Cysteinreste die Umgebung des Kupfers und somit die Elektrochemie der SOD im Vergleich zum Zustand an einer promotor-modifizierten Elektrode.

Ein Einfluss der jeweiligen Bindung und Orientierung eines Proteins auf sein elektrochemisches Verhalten ist in der Literatur mehrfach beschrieben. Im Falle des Cyt.c verschiebt sich das formale Potential durch kovalente Verknüpfung mit MUA im Vergleich zum adsorbierten Zustand um 35 mV (Ge und Lisdat 2002). Auch unterschiedliche Mischungsverhältnisse zwischen MUA und MU als Promotoren haben einen deutlichen Effekt. Insofern ist ein Unterschied zwischen den Eigenschaften der direkt an Gold gebundenen Mutanten und der an MPA adsorbierten SODs naheliegend. Gleiches gilt für den Unterschied zu dem formalen Potential der dimeren humanen Cu,Zn-SOD in Lösung (+72 mV, Azab et al. 1992)).

Für die kommerziell erhältliche Enzymform aus dem Rind wurden Werte zwischen +47 mV (Ge et al. 2003) und +65 mV (Tian et al. 2002b) publiziert. Unterschiede im formalen Potential des gleichen Enzyms aus verschiedenen Organismen sind ein häufig

beobachtetes Phänomen. So wurden etwa für das Kupferprotein Stellacyanin aus verschiedenen Organismen unter identischen Messbedingungen formale Potentiale zwischen +181 mV (*Rhus vernicifera*) und +265 (Cucumis sativa) ermittelt (Battistuzzi et al. 1999). Daher ist der beobachtete Unterschied des formalen Potentials der SODs aus Mensch und Rind nicht erstaunlich.

Die  $k_s$ -Werte der direkt auf der Goldoberfläche gebundenen Mutanten und der an MPA adsorbierten Mut1A und des Wildtyps unterscheiden sich nur wenig. Die geringfügige Verringerung der Distanz zwischen aktivem Zentrum und Elektrode führt also zu keiner Erhöhung der Geschwindigkeit des Elektronentransfers. Dies kann durch die Einschränkung der Flexibilität des Enzyms durch die chemisorbtive Bindung an die Goldoberfläche erklärt werden. Ähnliches wurde für bovine Cu,Zn-SOD an MPA-modifizierten Elektroden beobachtet. Eine Einschränkung der Flexibilität des Enzyms durch eine kovalente Fixierung senkte den  $k_s$ -Wert um einen Faktor von etwa 3 (Ge et al. 2003), obwohl sich dabei die Distanz zwischen aktivem Zentrum und Elektrodenoberfläche im Vergleich zum adsorbierten Zustand kaum verändert haben dürfte.

Die Menge an immobilisiertem elektrodenaktiven Protein ist für die SOD-Mutanten höher als für bisher beschriebene promotor-basierten SOD-Elektroden. Dies könnte einen Sensitivitätsgewinn bei einer sensorischen Anwendung ermöglichen.

Für eine sensorische Anwendung ist ferner das formale Potential von Bedeutung, da Interferenzen durch an der Elektrode umgesetzte Fremdstoffe vom angelegten Potential abhängig sind. In einem amperometrischen Ansatz muss eine sofortige Reoxidation bzw. –reduktion des Proteins durch die Elektrode gewährleistet sein. Daher sind im Falle von SOD-Elektroden Spannungen deutlich positiver als der Oxidationspeak (Reoxidation des Proteins) bzw. deutlich negativer als der Reduktionspeak (Reduktion der SOD) zu verwenden. Aufgrund der Lage des formalen Potentials der SOD-Mutanten kann aber ein verhältnismäßig interferenzarmes Messen vermutet werden, da die in der Literatur beschriebenen SOD-Elektroden in ähnlichen Potentialbereichen eingesetzt wurden.

Aufgrund dieser Ergebnisse stehen im Falle der SOD-Mutanten daher prinzipiell sowohl der Oxidations- als auch der Reduktionsbereich für eine elektrochemische Detektion von Superoxidradikalen zur Verfügung

#### 4.2.5 Zykovoltammetrische Studien der Interaktion von SOD-Elektroden mit dem Superoxidradikal

Die Reaktion zwischen dem immobilisierten Enzym (Mut1C) und dem Superoxidradikal wurde zunächst zykovoltammetrisch untersucht. Dabei wurde in der Messzelle während der Messung vom XOD-Xanthin-System kontinuierlich Superoxid produziert. Nach Aufnahme einer ersten Kurve wurde dann durch Zugabe externer Cu,Zn-SOD das Superoxidradikal aus der Messlösung entfernt und ein weiteres Zykovoltammogramm aufgenommen. Beide Kurven sind in Abb. 4.2.11 dargestellt.

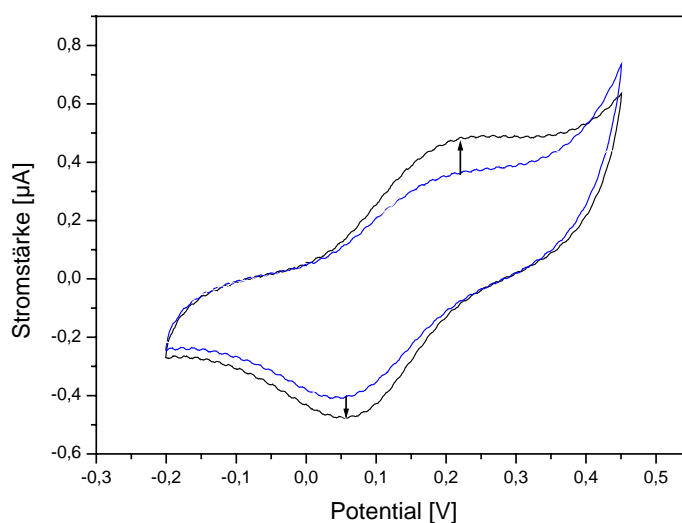
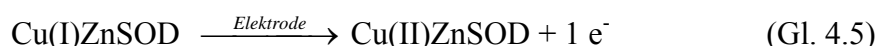
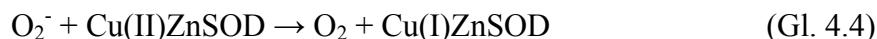


Abb. 4.2.11: Zykovoltammogramme von Mut1C-Elektroden in Gegenwart von Superoxid (schwarz) und nach Entfernung des Radikals (blau). Pfeile heben die Veränderungen des oxidativen und reduktiven Peaks hervor. (Scanrate 30 mV/s, 10 mU/ml XOD, 50 µM Xanthin, Puffer 4)

In Gegenwart des Radikals sind sowohl der oxidative als auch der reduktive Peak deutlich erhöht (durch Pfeile in Abb. 4.2.11 betont). Dabei bleibt die Peakform erhalten; das typische sigmoide Kurvenbild beim Auftreten von katalytischer Ströme wird nicht

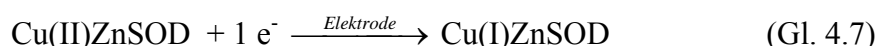
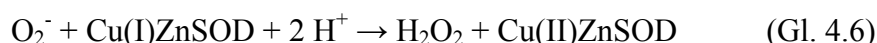
beobachtet. Dies wurde in ähnlicher Weise bereits für promotor-basierte SOD-Elektroden beschrieben (Ohsaka et al. 2002; Tian et al. 2002a).

Im positiveren Potentialbereich findet dabei die Oxidation des Kupfers durch die Elektrode nach dessen Reduktion durch das Radikal statt:



Eine Erhöhung des Strompeaks in Gegenwart des Radikals ist daher durch eine gleichzeitige Reduktion der SOD durch das Superoxid zu erklären.

Im negativeren Potentialfenster wird die zweite Teilreaktion der Dismutation nachgewiesen. Dabei reduziert die Elektrode das vom Radikal oxidierte aktive Zentrum:



Hier tritt eine Erhöhung des Peaks in negativer Richtung auf, da das von der Elektrode reduzierte Enzym durch das Radikal oxidiert wird und somit erneut durch die Elektrode reduziert werden kann.

Dieses Ergebnis zeigt, dass sowohl Oxidation als auch Reduktion des Radikals durch das Enzym stattfinden und beide Teilreaktionen elektrochemisch verfolgt werden können. Die Aktivität der SOD-Mutanten bleibt auch in immobilisiertem Zustand erhalten.

Die Interaktion mit dem Radikal erfolgt auf einer Zeitskala, die eine elektrochemische Detektion on-line ermöglicht. Dies beweist die erfolgreiche Einstellung der Signalkette Radikal-SOD-Elektrode und die prinzipielle Verwendbarkeit dieser SOD-Elektroden als Superoxidbiosensoren.

In amperometrischen Messanordnungen können beide Teilreaktionen für eine sensorische Messung genutzt werden, so dass zwei Potentialfenster (ca. -100 bis +50 mV sowie +150 bis +350 mV) zur Verfügung stehen.

#### 4.2.6 Amperometrische Superoxidmessungen mit SOD-Elektroden

Für erste Experimente wurden die Mutanten Mut1C (Einzelmutante) und Mut2A (Doppelmutante) ausgewählt und die Reaktion mit dem Superoxidradikal in beiden Potentialfenstern bei verschiedenen Potentialen amperometrisch studiert. Anstelle des Hypoxanthins wurde Xanthin verwendet, da HX bei kupferhaltigen Proteinen als Komplexbildner agieren und somit das Protein inaktivieren kann (Acevedo-Chavez und Costas 1999; Acevedo-Chavez et al. 1996).

Erste amperometrische Messungen wurden mit Mut1C bei +220 und +330 mV durchgeführt. Die Einstellung eines konstanten Hintergrundsignals dauerte in beiden Fällen etwa 60-90 s. Danach reagierte die Elektrode sofort auf den Beginn der Radikalproduktion durch Zugabe der XOD und zeigte eine sofortige Einstellung eines stationären Signalplateaus bei Erreichen der *steady-state* Konzentration des Superoxidradikals. Nach Zugabe von SOD in die Messlösung sank das Stromsignal schlagartig. Allerdings wurde eine neue Baseline oberhalb des Hintergrundsignals vor Beginn der Superoxidproduktion eingestellt. Die elektrochemische Antwort der Elektrode sank also trotz Entfernung des Radikals nicht auf Null.

Mehrere Substitutions- und Kontrollversuche, in denen der Einfluss der einzelnen Komponenten des Radikalproduktionssystems einzeln untersucht wurde, ergaben, dass dieser Effekt durch die kommerzielle XOD-Lösung hervorgerufen wird. Nach Aufreinigung der kommerziellen XOD-Präparation konnte eine komplette Signalunterdrückung durch SOD-Zugabe erzielt werden.

Für eine genauere Untersuchung der analytischen Anwendung der Elektroden wurden die Potentiale +220 mV (Oxidation der SOD durch die Elektrode) sowie -130 mV (Reduktion) ausgewählt.

Abb. 4.2.12 zeigt ein Amperogramm einer Mut1C-Elektrode bei +220 mV.

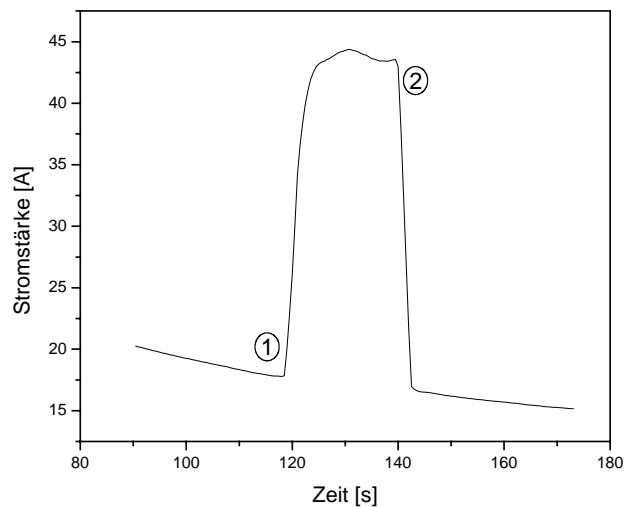


Abb. 4.2.12: Amperometrische Radikalmessung mit Mut1C bei +220 mV.  
1: Beginn der Radikalgenerierung. 2: Entfernung des Radikals aus der Lösung.  
(20 mU/ml XOD, 50  $\mu$ M Xanthin, Puffer 4)

Mit Beginn der Superoxidgenerierung durch Zugabe der XOD war sofort eine deutliche Signalveränderung in positiver Richtung festzustellen. Wurde durch Zugabe von SOD das Radikal dauerhaft aus der Messlösung entfernt, so ging das Signal auf das Ausgangsniveau vor Beginn der Radikalgenerierung zurück. Dies zeigt das spezifische Ansprechen der Elektrode auf das Superoxidradikal und die zeitnahe Verfolgung der Radikalkonzentrationsänderung bei Verwendung der aufgereinigten XOD.

Die Oxidation des Proteins durch das Radikal und die darauf folgende Reduktion durch die Elektrode wurde bei -130 mV untersucht. Hierbei sank das Signal nach Beginn der Radikalgenerierung und stieg nach Zugabe von SOD zur Lösung wieder auf das Ausgangsniveau an (s. Abb. 4.2.13).

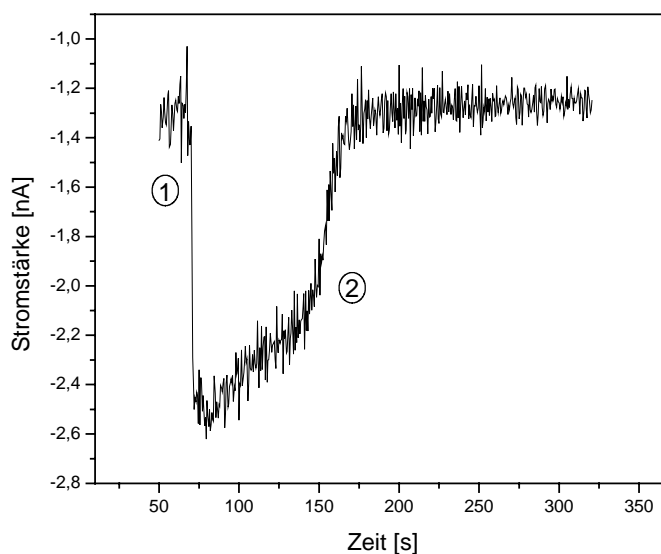


Abb. 4.2.13: Amperometrische Radikalmessung mit Mut1C bei -130 mV.  
1: Beginn der Radikalgenerierung. 2: Entfernung des Radikals aus der Lösung  
(20 mU/ml XOD, 50  $\mu$ M Xanthin, Puffer 4)

Diese Veränderung der Elektrodenantwort war also ausschließlich auf die Gegenwart des Radikals in der Lösung und seine Reaktion mit der SOD zurückzuführen. Daher kann auch diese Teilreaktion der SOD zur Superoxiddetektion genutzt werden.

Im positiven Potentialbereich bei +220 mV wurden allerdings deutlich höhere Signale erreicht, was dieses Potential für die Verwendung in der Radikaldetektion nahe legt.

Die Interaktion mit Superoxid und den übrigen 5 Mutanten ebenfalls bei diesem Potential wurde untersucht.

Mut2A zeigte bei +220 mV ebenfalls einen Signalanstieg nach Beginn der Radikalgenerierung. Die Zugabe von SOD zu der Messlösung erhöhte dieses Signal allerdings deutlich, statt es wieder zu senken. Somit kann nicht von einem spezifischen Anprechen auf das Radikal ausgegangen werden; stattdessen treten Störeffekte auf. Daher wurde Mut2A von weiteren amperometrischen Untersuchungen ausgeschlossen.

Alle anderen Mutanten sprachen selektiv auf Superoxid an und zeigten eine Signallöschung nach Zugabe von SOD in die Messzelle. Da keine ein höheres Signal als Mut1C lieferte und auch keine sonstigen Vorteile erkennbar waren, wurde diese für eine

genauere Charakterisierung der sensorischen Eigenschaften einer derartigen Elektrode verwendet.

Für eine Sensitivitätsbestimmung wurden die *steady-state*-Konzentrationen des Superoxidradikals bei verschiedenen XOD-Aktivitäten errechnet (Ge und Lisdat 2002). Da ein anderer Puffer sowie ein anderes Substrat als bei den Studien der Cyt.c-Elektroden Verwendung fand, wurde die Produktionsrate des Radikals ( $k_1$ ) unter den neuen Bedingungen photometrisch durch Bestimmung der Geschwindigkeit der Reduktion von Cyt.c durch das Radikal bei konstanter Xanthin-Konzentration (50  $\mu\text{M}$ ) und unterschiedlichen XOD-Aktivitäten ermittelt (s. Abb 4.2.14).

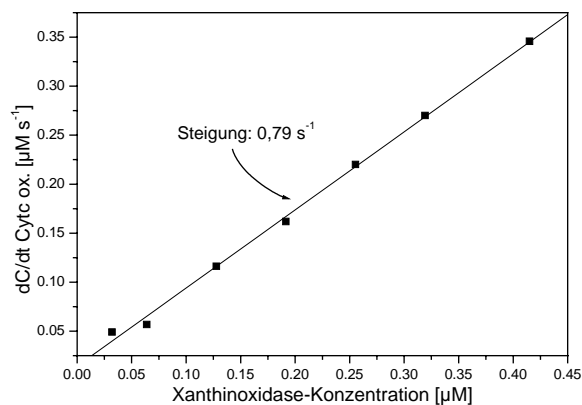


Abb. 4.2.14: Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Radikalbildung durch kinetische Untersuchung der Reduktion von Cyt.c bei 550 nm durch Superoxid bei verschiedenen XOD-Aktivitäten in Puffer 4.

Aus dieser Auftragung wurde ein  $k_1$  von  $0,79 \text{ s}^{-1}$  ermittelt und (analog zu Abschnitt 4.1.4) in Gleichung 4.8 eingesetzt. Für  $k_2$  wurde erneut der Literaturwert  $2,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bei pH 7,5 (Behar et al. 1970) verwendet und nach Gleichung 4.8 die jeweiligen stationären Superoxidkonzentrationen berechnet.

$$[O_2^-] = \sqrt{\frac{k_1}{2k_2}} [XOD] \quad (\text{Gl. 4.8})$$



Abb. 4.2.15 zeigt die lineare Abhängigkeit zwischen Superoxidkonzentration und dem dabei erzielten Messsignal. Aus der Steigung dieser Geraden wurde eine Sensitivität der Sensoren von  $0,23 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  errechnet.

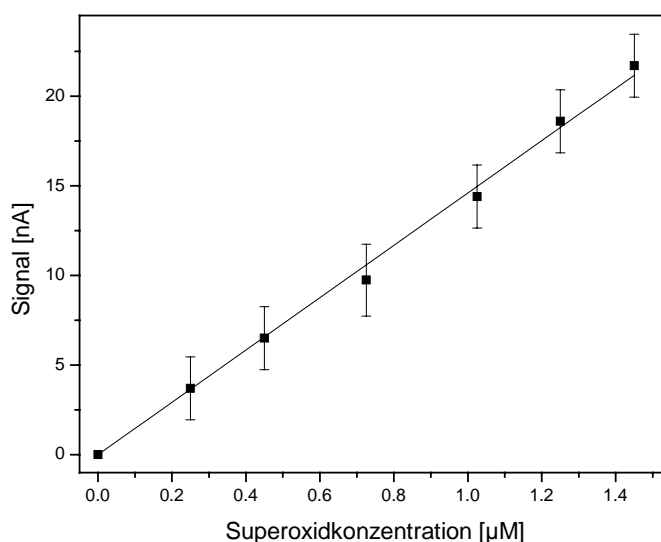


Abb. 4.2.15: Sensorsignal von Mut1C bei +220 mV in Abhängigkeit von der Radikalkonzentration zur Bestimmung der Empfindlichkeit des Sensors.

Die neuartigen SOD-Elektroden übertreffen die Cyt.c-Monoschichtelektroden bei der Empfindlichkeit etwa um den Faktor 10 (Ge und Lisdat 2002).

Diese Ergebnisse demonstrieren erfolgreich das Konzept, den direkten Elektronentransfer zwischen einer Goldelektrode und einer SOD mit molekularbiologisch eingefügtem Cystein-Rest für die empfindliche Detektion des Superoxidradikals zu nutzen.

Ein Vergleich mit der Empfindlichkeit anderer SOD-Superoxidsensoren ist schwierig, da die Autoren bei der Kalibration der jeweiligen Sensoren die spontane Dismutation des Superoxidradikals nicht einbeziehen (Ohsaka et al. 2002; Tian et al. 2002a) und somit ihr Sensorsignal allein an der Produktionsrate des Radikals, und nicht an der *steady-state*-Konzentration, orientieren. Eine Abschätzung der veröffentlichten Messkurven lässt vermuten, dass die Empfindlichkeit der dort vorgestellten Elektroden vermutlich in einer ähnlichen Größenordnung wie die des hier vorgestellten Sensors liegt. Es ist anzumerken, dass in beiden Arbeiten die Zugabe von SOD das Superoxidsignal der Elektrode nicht zu

100% zu löschen vermag, so dass ein kleiner Anteil des Signals auf den Einfluss anderer Substanzen zurückzuführen ist.

#### 4.2.6.1 Einfluss von Interferenzen

Die Praxistauglichkeit der SOD-Elektroden hängt auch von der Interferenz der potentiellen Störsubstanzen Harnsäure,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Ascorbinsäure ab. In amperometrischen Studien wurden daher Mut1C-modifizierte Elektroden auf +220 mV sowie auf -130 mV in Puffer 4 polarisiert. In Abwesenheit des radikalgenerierenden Enzymsystems wurden Aliquots der Störsubstanzen der Lösung zugesetzt, bis eine deutliche Veränderung der Stromantwort (mehr als 1 nA) der Elektrode auftrat.

Tabelle 4.2.3 zeigt die Grenzwerte, unterhalb derer kein Einfluss der Substanzen auf den sensorischen Strom beobachtet wurde. Dem gegenübergestellt sind die im humanen Serum auftretenden Konzentrationen dieser Stoffe sowie die Konzentrationen, die bei der Sensorkalibration und der *in vitro*-Radikalbestimmungen erzeugt werden können.

Substanz	Grenzwert bei +220 mV	Grenzwert bei -130 mV	Serumkonzentration	Typische Konzentration <i>in vitro</i>
$\text{H}_2\text{O}_2$	1,8 mM	< 70 $\mu\text{M}$	<< 125 $\mu\text{M}$	<100 $\mu\text{M}$
Harnsäure	450 $\mu\text{M}$	1,2 mM	80-350 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$
Ascorbinsäure	80 $\mu\text{M}$	---	10-90 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$ (ca. 10* $\text{IC}_{50}$ )

Tabelle 4.2.3: Grenzwert der Interferenz von Störsubstanzen im Vergleich zu den typischerweise bei *in vitro*-Experimenten auftretenden Konzentrationen und der humanen Serumkonzentration (Lentner 1984).

Die angegebenen Serumkonzentrationen von Ascorbinsäure und Harnsäure beziehen sich auf den menschlichen Körper und sind dem Standardwerk *Geigy Scientific Tables* (Lentner 1984) entnommen; für Tierexperimente, z.B. an Ratten, ist aber von vergleichbaren Mengen auszugehen. Typische  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Serumkonzentrationen waren nicht zu entnehmen. Stattdessen wird die Beobachtung herangezogen, dass 125  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  für menschliche Zellkulturen letal ist (Spector et al. 2000). Auf Grund dessen sowie der Aktivität von

Catalasen und Peroxidasen im Organismus wird eine Serumkonzentration von  $\text{H}_2\text{O}_2$  von deutlich unter 100  $\mu\text{M}$  angenommen.

Bei einem Potential von -130 mV können schon verhältnismäßig geringe  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen das Sensorsignal beeinflussen. Dies würde die Einsetzbarkeit der SOD-Elektroden stark einschränken, da  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Nebenprodukt bei der Radikalgenerierung durch das XOD- System und auch bei der spontanen oder katalysierten Dismutation des Superoxids in ähnlichen Größenordnungen entsteht. Auch für *in vivo*-Untersuchungen stellt dies ein gravierendes Problem dar.

Im Potentialbereich um +220 mV hingegen besteht keine Gefahr der Signalveränderung durch die drei Substanzen. Die *in vitro* auftretenden Konzentrationen liegen deutlich unter den Grenzwerten des Sensors. Auch für *in vivo*-Experimente sind gravierende Interferenzen nicht zu erwarten, obwohl die Grenzkonzentration von Ascorbinsäure im Bereich der möglichen Serumkonzentrationen liegt.

Damit kann die Mut1C-Elektrode bei +220 mV zum quantitativen Superoxidnachweis verwendet werden, da sie mit großer Empfindlichkeit auf das Radikal anspricht, ohne dass eine Signalverfälschung durch andere Substanzen zu befürchten ist.

#### **4.2.6.2 Stabilität der SOD-Elektroden**

Die Stabilität der mit SOD-Mutanten modifizierten Elektroden wurde durch Untersuchung der Lagerungsstabilität sowie durch mehrfache amperometrische Messungen bestimmt.

Zwei Mut1C-Elektroden wurden nach der Präparation vermessen und dann über 7 Tage bei 4°C gelagert. Täglich wurde ein Zyklovoltammogramm aufgenommen und daraus die Menge an elektrodenaktivem Protein errechnet. Abb. 4.2.16 zeigt die Abnahme dieser Menge prozentual im Vergleich zur Messung direkt nach der Präparation.

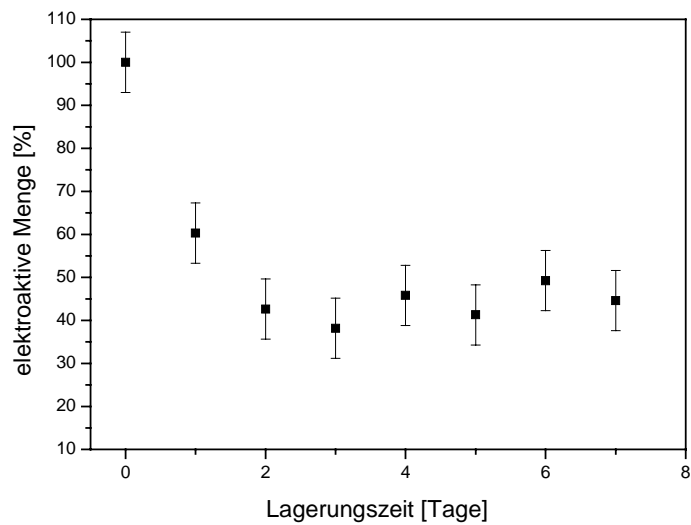


Abb. 4.2.16: Stabilität der Mut1C-Elektrode bestimmt als elektrodenaktive Proteinmenge im Zyklovoltammogramm über 8 Tage (zwischenzeitliche Lagerung bei +4°C in Puffer 4)

In den ersten beiden Tagen sinkt die elektroaktive Menge deutlich. Nach 3 Tagen Lagerung hingegen stabilisiert sich dieser Wert und bleibt für die Dauer der Untersuchung bei etwa 40%.

Die Stabilität der Elektroden im sensorischen Einsatz wurde durch mehrfach aufeinander folgende Superoxidmessungen mit derselben Elektrode ermittelt.

Die so gefundene Stabilität der Elektrode war sehr gering. Bei der zweiten amperometrischen Messung wurde unter identischen Bedingungen ein deutlich schlechteres Ansprechen im Vergleich zum Ausgangssignals erreicht. Die Belastungen durch die Messungen (Rühren, Interaktion mit dem Radikal und die Gegenwart von XOD sowie Substrat und Produkten) beschädigten offenbar die Modifikation der Elektrode so stark, dass mehrfaches Messen unmöglich gemacht wird.

Stabilisierungsversuche durch Vorkonditionierung der Elektrode mit Potentialvariationen oder die Beimischung und kovalente Verknüpfung mit Alkanthiolen waren nicht erfolgreich.

Somit ist die Stabilität der SOD-Elektroden für *in vivo*-Superoxidbestimmungen nicht ausreichend. Für *in vitro*-Experimente hingegen können die neuen Sensoren eingesetzt werden. Der geringen Stabilität steht hier vor allem die einfache und schnelle Elektrodenpräparation gegenüber, so dass mehrere Elektroden für eine Messreihe ohne größeren Aufwand hergestellt werden können.

## 5. Zusammenfassung

Das Superoxidradikal  $O_2^-$  kann im Körper mit fast allen Bestandteilen von Zellen reagieren und diese schädigen. Es wird durch enzymatische und nicht-enzymatische Radikalfänger bekämpft, die teilweise dem Körper durch die Nahrung zugeführt werden müssen. In der medizinischen Forschung wurde eine Beteiligung des Radikals an Erkrankungen wie Krebs, Herzinfarkten, dem Reperfusionssyndrom und neuraler Degeneration festgestellt. Gleichzeitig übernimmt es wichtige Funktionen bei der Abwehr von Fremdorganismen, in der Signalleitung und im Stoffwechsel einiger Arten.

Ein empfindlicher quantitativer Superoxidnachweis ist daher zum besseren Verständnis von Krankheitsverläufen ebenso wichtig wie für die Charakterisierung der Effektivität von Antioxidantien und der Untersuchung von Stoffwechselprozessen. Dabei stellen die geringen Konzentrationen, in welchen Superoxid in biologischen Systemen auftritt, und seine geringe Lebensdauer im Millisekunden- bis Sekundenbereich große Anforderungen an die analytische Herangehensweise.

Ziel dieser Arbeit war es zum einen, zwei neuartige Proteinarchitekturen auf Metallelektroden zu entwickeln und deren elektrochemisches Ansprechverhalten zu charakterisieren. Zum anderen waren diese Elektroden zur empfindlichen quantitativen Superoxiddetektion einzusetzen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine Protein-Multischichtelektrode aus Cytochrom c und dem Polyelektrolyten Poly(anilinsulfonsäure) nach dem *Layer-by-layer*-Verfahren aufgebaut. Die Erstellung von Multischichten wurde durch SPR nachgewiesen. Für zwei bis 15 Schichten an Protein konnte eine deutliche Zunahme an elektrodenaktivem Cytochrom c mit jedem zusätzlichen Aufbringungsschritt nachgewiesen werden. Diese Zunahme verlief linear und ergab bei 15 Schichten eine Zunahme der redoxaktiven Proteinmenge um deutlich mehr als eine Größenordnung im Vergleich zur Monoschichtelektrode. Während das formale Potential im Multischichtsystem sich im Vergleich zur Monoschichtelektrode nicht veränderte, wurde für die Kinetik der Redoxtransformation eine Abhängigkeit der Geschwindigkeit des Elektronentransfers von der Zahl der Proteinschichten beobachtet. Mit zunehmender Scangeschwindigkeit trat ein

fortlaufender, reversibler Kontaktverlust zu Proteinmolekülen in den äußeren Schichten auf.

Die lineare Zunahme an elektroaktivem Protein mit steigender Zahl an Depositionsschritten unterscheidet sich deutlich von in der Literatur beschriebenen Protein/Polyelektrolyt-Multischichtelektroden, bei denen ab etwa 6-8 Schichten keine Zunahme an elektroaktivem Protein mit zusätzlichen Proteinschichten mehr festgestellt werden konnte. Auch ist bei diesen die Zunahme an kontaktierbaren Proteinmolekülen auf das Zwei- bis Fünffache der Menge einer Monoschichtelektrode limitiert.

Diese Unterschiede des neu vorgestellten Systems zu bisherigen Multischichtassemblaten erklärt sich aus einem in dieser Arbeit für derartige Systeme erstmals beschriebenen Elektronentransfermechanismus, der durch verschiedene Substitutionsexperimente plausibel gemacht werden konnte. Der Transport von Elektronen zwischen der Elektrodenoberfläche und den Proteinmolekülen in den Schichten verläuft über einen Protein-Protein-Elektronenaustausch, während der Polyelektrolyt im System nur dem Aufbau und der Stabilisierung des Assemblats dient. Dieser Mechanismus beruht auf dem schnellen Selbstaustausch von Cytochrom c-Molekülen und einer verbleibenden Rotationsflexibilität des Proteins im Multischichtsystem. Wird letztere durch eine kovalente Verknüpfung oder den Einsatz eines stärker bindenden Polyelektrolyten eingeschränkt, kommt es zu einem irreversiblen Verlust an kontaktierbarem Protein.

Die Reduzierung des Proteins im Assemblat durch das Superoxidradikal und eine anschließende Reoxidation durch die Elektrode konnten nachgewiesen werden. In einem amperometrischen Messansatz wurde die Stärke des durch Superoxidradikale hervorgerufenen elektrochemischen Signals in Abhängigkeit von der Zahl an Proteinschichten gemessen. Ein maximales Ansprechverhalten auf das Radikal wurde mit 6-Schichtelektroden erzielt, die einen Kompromiss zwischen der Menge an elektrodenaktivem Protein und der Zugänglichkeit der Proteinmoleküle für das in der Lösung befindliche Radikal darstellen.

Die Empfindlichkeit der 6-Schichtelektroden betrug  $0,398 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ , was im Vergleich zum Literaturwert der Monoschichtelektrode eine Verbesserung um den Faktor 14, also mehr als eine Größenordnung, darstellt.

Durch eine Temperaturbehandlung der Elektroden vor Beginn der Superoxidmessung konnte die Stabilität erhöht werden, so dass 10 aufeinander folgende amperometrische Messungen keinen Verlust von elektroaktivem Protein hervorriefen. Untersuchungen mit dem Modellantioxidans Ascorbinsäure zeigten, dass eine Vergleichbarkeit der Charakterisierung von Antioxidantien mit den Mono- und Multischichtelektroden gegeben ist.

Die elektrodenaktiven Nebenprodukte der radikalgenerierenden Reaktion zeigten im relevanten Konzentrationsbereich keine Interferenzen an der Multischichtelektrode.

Somit konnte eine Elektrode mit 6 Schichten aus Cytochrom c und Poly(anilinsulfonsäure) als neuartiger Superoxidsensor mit einer 14-fachen Verbesserung der Empfindlichkeit im Vergleich zum bislang benutzten System entwickelt werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschreibt die Auswahl, Gewinnung und Charakterisierung von Mutanten des Proteins Cu,Zn-Superoxiddismutase zur elektrochemischen Quantifizierung von Superoxidradikalen.

Monomere Mutanten des humanen dimeren Enzyms wurden entworfen, die durch Austausch von Aminosäuren ein oder zwei zusätzliche Cysteinreste besaßen, mit welchem sie direkt auf der Goldelektrodenoberfläche chemisorbieren sollten.

Bei einem Arbeitsaufenthalt an der Universität Florenz wurden günstige Positionen zum Aminosäureaustausch durch Computermodellierung ausgewählt. Plasmide mit der genetischen Information von 6 derartigen Mutanten wurden erstellt und in bakterielle Zellen überführt. Alle 6 Mutanten konnten in ausreichender Menge und Reinheit in aktiver Form gewonnen werden.

Die Bindung der Superoxiddismutase-Mutanten an Goldoberflächen konnte durch Oberflächen-plasmonresonanz und Impedanzspektroskopie nachgewiesen werden.

Die Inkubation von gereinigten Golddrahtelektroden in Lösungen dieser Proteinmutanten führte zur Erstellung von Proteinelektroden, die für alle Mutanten einen quasi-reversiblen Elektronentransfer zwischen SOD und Elektrode aufwiesen. Durch parallele Untersuchung von kupferfreien SOD-Mutanten sowie des Wildtyps konnte nachgewiesen werden, dass die Mutanten über die eingefügten Cysteinreste auf der Elektrode chemisorptiv gebunden



wurden und der Elektronentransfer zwischen der Elektrode und dem Kupfer im aktiven Zentrum der SOD erfolgte.

Das formale Potential der so immobilisierten Proteine war im Vergleich zum Wildtyp leicht positiv verschoben. Die Geschwindigkeit des Elektronentransfers war kaum größer als für den Wildtyp auf einem kurzkettigen Promotor, was mit einer eingeschränkten Flexibilität der Mutanten durch die direkte Bindung auf der Oberfläche erklärt werden kann.

Die Superoxiddismutase katalysiert die Zersetzung von Superoxidmolekülen durch Oxidation und durch Reduktion der Radikale. Somit sind beide Teilreaktionen von analytischem Interesse.

Zyklovoltammetrisch konnte sowohl die Oxidation als auch die Reduktion des Radikals durch die immobilisierten Superoxiddismutase-Mutanten nachgewiesen werden.

In amperometrischen Messanordnungen konnten beide Teilreaktionen zur analytischen Quantifizierung von Superoxidradikalen genutzt werden. Bei der Reduzierung des Radikals durch das Enzym wurden die deutlich höheren Signale festgestellt. Die Empfindlichkeit des Sensors betrug in dieser Konfiguration  $0,23 \text{ A M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ , eine Verbesserung der Empfindlichkeit einen Faktor von etwa 10 gegenüber der Cytochrom c-Monoschichtelektrode.

Im diesem Potentialfenster erfüllt die Superoxiddismutase-Elektrode die Anforderungen für interferenzfreies Messen *in vivo* und *in vitro*. Bei der anderen Teilreaktion, also bei der Oxidation des Radikals durch das Protein im negativeren Potentialfenster, trat ein Störsignal bei verhältnismäßig geringen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid auf.

Während die Elektroden auf Grund einer eingeschränkten Stabilität für *in vivo*-Anwendungen nicht geeignet erscheinen, sind sie für eine Verwendung bei *in vitro*-Untersuchungen wegen der hohen Sensitivität und der sehr einfachen und schnellen Herstellung, gerade im Vergleich zu den Multischichtsystemen, ein sehr vorteilhaftes System.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Ansätze zur Immobilisierung von elektroaktivem Protein auf Goldelektroden untersucht. Der Mechanismus und die Parameter des Elektronentransfers zwischen Protein und Elektrode wurden ausführlich charakterisiert und mit beiden Systemen eine drastische Verbesserung der Sensitivität gegenüber bislang beschriebenen elektrochemischen Superoxidsensoren erzielt, so dass die gesetzten Ziele der Arbeit voll erfüllt werden konnten.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abbruzzetti, S., C. Viappiani, et al. (2004). "Kinetics of histidine dissociation from the heme Fe(III) in N-fragment (residues 1-56) of cytochrome c." Protein Journal **23**(8): 519-527.
- Acevedo-Chavez, R. and M. E. Costas (1999). "Spectral and magnetic studies of the polynuclear compound Cu(II)(hypoxanthine(2-))(H<sub>2</sub>O)(2) (n)." Polyhedron **18**(11): 1549-1553.
- Acevedo-Chavez, R., M. E. Costas, et al. (1996). "Allopurinol- and hypoxanthine-copper(II) compounds. Spectral and magnetic studies of novel dinuclear coordination compounds with bridging hypoxanthine." Inorganic Chemistry **35**(25): 7430-7439.
- Afanasev, I. B., V. V. Grabovetskii, et al. (1987). "Kinetics and Mechanism of the Reactions of Superoxide Ion in Solution .5. Kinetics and Mechanism of the Interaction of Superoxide Ion with Vitamin-E and Ascorbic-Acid." Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions **2**(3): 281-285.
- Allen, H., O. Hill, et al. (1997). "The transient nature of the diffusion controlled component of the electrochemistry of cytochrome c at 'bare' gold electrodes: an explanation based on a self-blocking mechanism." Journal of Electroanalytical Chemistry **436**(1-2): 17-25.
- Allen, P. M., H. A. O. Hill, et al. (1984). "Surface Modifiers for the Promotion of Direct Electrochemistry of Cytochrome-C." Journal of Electroanalytical Chemistry **178**(1): 69-86.
- Avila, A., B. W. Gregory, et al. (2000). "An electrochemical approach to investigate gated electron transfer using a physiological model system: Cytochrome c immobilized on carboxylic acid-terminated alkanethiol self- assembled monolayers on gold electrodes." Journal of Physical Chemistry B **104**(12): 2759-2766.
- Azab, H. A., L. Banci, et al. (1992). "Redox Chemistry of Superoxide-Dismutase - Cyclic Voltammetry of Wild-Type Enzymes and Mutants on Functionally Relevant Residues." Inorganic Chemistry **31**(22): 4649-4655.
- Bain, C. D., E. B. Troughton, et al. (1989). "Formation of Monolayer Films by the Spontaneous Assembly of Organic Thiols from Solution onto Gold." Journal of the American Chemical Society **111**(1): 321-335.
- Banci, L., I. Bertini, et al. (1990). "Investigation of Copper-Zinc Superoxide-Dismutase Ser-137 and Ala-137 Mutants." Inorganic Chemistry **29**(13): 2398-2403.
- Banci, L., I. Bertini, et al. (1991). "Advances in the Understanding of the Structure-Function Relationship in Cu,Zn Superoxide-Dismutase." Free Radical Research Communications **12-3**: 239-251.
- Banci, L., I. Bertini, et al. (2002). "Structure and dynamics of copper-free SOD: The protein before binding copper." Protein Sci **11**(10): 2479-2492.
- Banci, L., I. Bertini, et al. (1999). "The solution structure of a monomeric, reduced form of human copper, zinc superoxide dismutase bearing the same charge as the native protein." Journal of Biological Inorganic Chemistry **4**(6): 795-803.
- Barbacanne, M. A., J. P. Souchar, et al. (2000). "Detection of superoxide anion released extracellularly by endothelial cells using cytochrome c reduction, ESR,

- fluorescence and lucigenin-enhanced chemiluminescence techniques." Free Radical Biology and Medicine **29**(5): 388-396.
- Battistuzzi, G., M. Borsari, et al. (1999). "Redox thermodynamics of blue copper proteins." Journal of the American Chemical Society **121**(3): 501-506.
- Behar, D., G. Czapski, et al. (1970). "Acid Dissociation Constant and Decay Kinetics of Perhydroxyl Radical." Journal of Physical Chemistry **74**(17): 3209-3213.
- Beissenhirtz, M., F. Scheller, et al. (2003). "Immobilized cytochrome c sensor in organic/aqueous media for the characterization of hydrophilic and hydrophobic antioxidants." Electroanalysis **15**(18): 1425-1435.
- Beissenhirtz, M. K., J. Kafka, et al. (2005). "Electrochemical quartz crystal microbalance studies on cytochrome c/polyelectrolyte multilayer assemblies on gold electrodes." Electroanalysis **accepted**.
- Beissenhirtz, M. K., R. C. H. Kwan, et al. (2004). "Comparing an In Vitro Electrochemical Measurement of Superoxide Scavenging Activity with an In Vivo Assessment of Antioxidant Potential in Chinese Tonifying Herbs." Phytotherapy Research **18**: 149-153.
- Bertini, I., S. Mangani, et al. (1998). Structure and properties of copper-zinc superoxide dismutases. Advances in Inorganic Chemistry, Vol 45. San Diego, ACADEMIC PRESS INC. **45**: 127-250.
- Bier, F. F., E. EhrentreichForster, et al. (1997). "A redox-label immunosensor on basis of a bi-enzyme electrode." Analytica Chimica Acta **344**(1-2): 119-124.
- Boissinot, M., S. Karnas, et al. (1997). "Function of the Greek key connection analysed using circular permutants of superoxide dismutase." Embo Journal **16**(9): 2171-2178.
- Brand, M. D., C. Affourtit, et al. (2004). "Mitochondrial superoxide: Production, biological effects, and activation of uncoupling proteins." Free Radical Biology and Medicine **37**(6): 755-767.
- Brautigam, D. L., S. Fergusonmiller, et al. (1978a). "Definition of Cytochrome-C Binding Domains by Chemical Modification .1. Reaction with 4-Chloro-3,5-Dinitrobenzoate and Chromatographic-Separation of Singly Substituted Derivatives." Journal of Biological Chemistry **253**(1): 130-139.
- Brautigam, D. L., S. Fergusonmiller, et al. (1978b). "Definition of Cytochrome-C Binding Domains by Chemical Modification .2. Identification and Properties of Singly Substituted Carboxydinitrophenyl Cytochromes-C at Lysines 8, 13, 22, 27, 39, 60, 72, 87, and 99." Journal of Biological Chemistry **253**(1): 140-148.
- Brynda, E. and M. Houska (1998). "Preparation of organized protein multilayers." Macromolecular Rapid Communications **19**(4): 173-176.
- Buttemeyer, R., A. W. Philipp, et al. (2002). "In vivo measurement of oxygen-derived free radicals during reperfusion injury." Microsurgery **22**(3): 108-113.
- Buttemeyer, R., A. W. Philipp, et al. (2003). "Epigallocatechin gallate can significantly decrease free oxygen radicals in the reperfusion injury in vivo." Transplantation Proceedings **35**(8): 3116-3120.
- Cadenas, E. (1989). "Biochemistry Of Oxygen Toxicity." Annual Review of Biochemistry(58): 79-110.
- Campanella, L., S. De Luca, et al. (2001). "Superoxide dismutase biosensors working in non-aqueous solvent." Fresenius Journal of Analytical Chemistry **369**(7-8): 594-600.

- Campas, M. and C. O'Sullivan (2003). "Layer-by-layer biomolecular assemblies for enzyme sensors, immunosensing, and nano architectures." Analytical Letters **36**(12): 2551-2569.
- Carloz, A. and D. Touati (1986). "Isolation of Superoxide-Dismutase Mutants in Escherichia-Coli - Is Superoxide-Dismutase Necessary for Aerobic Life." Embo Journal **5**(3): 623-630.
- Carmon, K. S., R. E. Baltus, et al. (2004). "A piezoelectric quartz crystal biosensor: The use of two single cysteine mutants of the periplasmic Escherichia coli glucose/galactose receptor as target proteins for the detection of glucose." Biochemistry **43**(44): 14249-14256.
- Caruso, F., K. Niikura, et al. (1997). "Assembly of alternating polyelectrolyte and protein multilayer films for immunosensing .2." Langmuir **13**(13): 3427-3433.
- Caruso, F. and C. Schuler (2000). "Enzyme multilayers on colloid particles: Assembly, stability, and enzymatic activity." Langmuir **16**(24): 9595-9603.
- Caruso, F., D. Trau, et al. (2000). "Enzyme encapsulation in layer-by-layer engineered polymer multilayer capsules." Langmuir **16**(4): 1485-1488.
- Chaniotakis, N. A. (2004). "Enzyme stabilization strategies based on electrolytes and polyelectrolytes for biosensor applications." Analytical and Bioanalytical Chemistry **378**(1): 89-95.
- Chen, R., J. T. Warden, et al. (2004). "Microdialysis sampling combined with electron spin resonance for superoxide radical detection in microliter samples." Analytical Chemistry **76**(16): 4734-4740.
- Chen, X. H., H. Xie, et al. (2001). "Characterization for didodecyldimethylammonium bromide liquid crystal film entrapping catalase with enhanced direct electron transfer rate." Biosensors & Bioelectronics **16**(1-2): 115-120.
- Chi, Q. J., J. D. Zhang, et al. (2000). "Molecular monolayers and interfacial electron transfer of Pseudomonas aeruginosa azurin on Au(111)." Journal of the American Chemical Society **122**(17): 4047-4055.
- Choudhury, S. B., J. W. Lee, et al. (1999). "Examination of the nickel site structure and reaction mechanism in Streptomyces seoulensis superoxide dismutase." Biochemistry **38**(12): 3744-3752.
- Christenson, A., N. Dimcheva, et al. (2004). "Direct electron transfer between ligninolytic redox enzymes and electrodes." Electroanalysis **16**(13-14): 1074-1092.
- Chung, H. Y., B. S. Baek, et al. (1997). "Xanthine dehydrogenase xanthine oxidase and oxidative stress." Age **20**(3): 127-140.
- Cooper, J. M., K. R. Greenough, et al. (1993). "Direct Electron-Transfer Reactions between Immobilized Cytochrome-C and Modified Gold Electrodes." Journal of Electroanalytical Chemistry **347**(1-2): 267-275.
- Cornell, N. W. and K. E. Crivaro (1972). "Stability Constant for Zinc-Dithiothreitol Complex." Analytical Biochemistry **47**(1): 203-207.
- Cramaro, F., F. Cantini, et al. (2001). "Superoxide dismutase: structure, mobility and function." Journal of Inorganic Biochemistry **86**(1): 499-499.
- Daiber, A., M. Oelze, et al. (2004). "Detection of superoxide and peroxynitrite in model systems and mitochondria by the luminol analogue L-012." Free Radical Research **38**(3): 259-269.
- Datta, K. S., S. Sinha, et al. (2000). "Reactive oxygen species in health and disease." National Medical Journal of India **13**(6): 304-310.

- Decher, G. and J. D. Hong (1991). "Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process .2. Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles and Polyelectrolytes on Charged Surfaces." Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics **95**(11): 1430-1434.
- Di Felice, R. and A. Selloni (2004). "Adsorption modes of cysteine on Au(111): Thiolate, amino-thiolate, disulfide." Journal of Chemical Physics **120**(10): 4906-4914.
- Di, J. W., S. P. Bi, et al. (2004). "Third-generation superoxide anion sensor based on superoxide dismutase directly immobilized by sol-gel thin film on gold electrode." Biosensors & Bioelectronics **19**(11): 1479-1486.
- Dopner, S., P. Hildebrandt, et al. (1999). "The structural and functional role of lysine residues in the binding domain of cytochrome c in the electron transfer to cytochrome c oxidase." European Journal of Biochemistry **261**(2): 379-391.
- Dryhurst, G., K. M. Kadish, et al. (1982). Bioelectrochemistry. New York, Academic Press.
- Eddowes, M. J. and H. A. O. Hill (1977). "Novel Method for Investigation of Electrochemistry of Metalloproteins - Cytochrome-C." Journal of the Chemical Society-Chemical Communications(21): 771-772.
- Eddowes, M. J., H. A. O. Hill, et al. (1979). "Electrochemistry of Cytochrome-C - Comparison of the Electron-Transfer at a Surface-Modified Gold Electrode with That to Cytochrome-Oxidase." Journal of the American Chemical Society **101**(23): 7113-7114.
- Edwards, R. A., H. M. Baker, et al. (1998). "Crystal structure of Escherichia coli manganese superoxide dismutase at 2.1-angstrom resolution." Journal of Biological Inorganic Chemistry **3**(2): 161-171.
- Ellerby, L. M., D. E. Cabelli, et al. (1996). "Copper-zinc superoxide dismutase: Why not pH-dependent?" Journal of the American Chemical Society **118**(28): 6556-6561.
- Fei, S. D., J. H. Chen, et al. (2005). "Electrochemical behavior Of L-cysteine and its detection at carbon nanotube electrode modified with platinum." Analytical Biochemistry **339**(1): 29-35.
- Feng, Z. Q., S. Imabayashi, et al. (1997). "Long-range electron-transfer reaction rates to cytochrome c across long- and short-chain alkanethiol self-assembled monolayers: Electroreflectance studies." Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions **93**(7): 1367-1370.
- Ferapontova, E., K. Schmengler, et al. (2002). "Effect of cysteine mutations on direct electron transfer of horseradish peroxidase on gold." Biosensors & Bioelectronics **17**(11-12): 953-963.
- Ferapontova, E. E. and L. Gorton (2001). "Effect of proton donors on direct electron transfer in the system gold electrode-horseradish peroxidase." Electrochemistry Communications **3**(12): 767-774.
- Ferguson-Miller, S., D. L. Brautigan, et al. (1978). "Definition of Cytochrome-C Binding Domains by Chemical Modification .3. Kinetics of Reaction of Carboxydinitrophenyl Cytochromes-C with Cytochrome-C Oxidase." Journal of Biological Chemistry **253**(1): 149-159.
- Fink, B., K. Laude, et al. (2004). "Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and intact tissues using dihydroethidium and an HPLC-based assay." American Journal of Physiology-Cell Physiology **287**(4): C895-C902.
- Fink, R. C. and J. G. Scandalios (2002). "Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their

- relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases." Archives of Biochemistry and Biophysics **399**(1): 19-36.
- Forlano, P., J. A. Olabe, et al. (1997). "The mechanism of oxidation of 3-mercaptopropionic acid." Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie **75**(1): 9-13.
- Frahry, G. and P. Schopfer (2001). "NADH-stimulated, cyanide-resistant superoxide production in maize coleoptiles analyzed with a tetrazolium-based assay." Planta **212**(2): 175-183.
- Frew, J. E. and H. A. O. Hill (1988). "Direct and Indirect Electron-Transfer between Electrodes and Redox Proteins." European Journal of Biochemistry **172**(2): 261-269.
- Fridovich, I. (1972). "Superoxide Radical and Superoxide Dismutase." Accounts of Chemical Research **5**(10): 321-326.
- Fridovich, I. (1978). "Biology of Oxygen Radicals." Science **201**(4359): 875-880.
- Fridovich, I. (1986). "Superoxide Dismutases." Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology **58**: 61-97.
- Fridovich, I. (1998). "Oxygen: The dark side." Age **21**(2): 77-77.
- Fridovich, I. and J. M. McCord (1970). "Quantitative Aspects of Production of Superoxide Anion Radical by Milk Xanthine Oxidase." Journal of Biological Chemistry **245**(16): 4053-4059
- Fultz, M. L. and R. A. Durst (1982). "Mediator Compounds for the Electrochemical Study of Biological Redox Systems - a Compilation." Analytica Chimica Acta **140**(1): 1-18.
- Gamaley, I. A. and I. V. Klyubin (1999). Roles of reactive oxygen species: Signaling and regulation of cellular functions. International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 188. **188**: 203-255.
- Ge, B. and F. Lisdat (2002). "Superoxide sensor based on cytochrome c immobilized on mixed- thiol SAM with a new calibration method." Analytica Chimica Acta **454**(1): 53-64.
- Ge, B., T. Meyer, et al. (2000). "Cytochrome c' from *Chromatium vinosum* on gold electrodes." Electrochemistry Communications **2**(8): 557-561.
- Ge, B., F. W. Scheller, et al. (2003). "Electrochemistry of immobilized CuZnSOD and FeSOD and their interaction with superoxide radicals." Biosensors & Bioelectronics **18**(2-3): 295-302.
- Getzoff, E. D., D. E. Cabelli, et al. (1992). "Faster Superoxide-Dismutase Mutants Designed by Enhancing Electrostatic Guidance." Nature **358**(6384): 347-351.
- Gole, A., P. Chaudhari, et al. (2001). "Protein-friendly intercalation of cytochrome c and hemoglobin into thermally evaporated anionic and cationic lipid films: A new approach based on diffusion from solution." Langmuir **17**(18): 5646-5656.
- Gordon, M. H. (1996). "Dietary antioxidants in disease prevention." Natural Product Reports **13**(4): 265-273.
- Gros, P. and M. Comtat (2004). "A bioelectrochemical polypyrrole-containing Fe(CN)<sub>6</sub>(3-) interface for the design of a NAD-dependent reagentless biosensor." Biosensors & Bioelectronics **20**(2): 204-210.
- Gu, H. Y., A. M. Yu, et al. (2002). "Amperometric nitric oxide biosensor based on the immobilization of hemoglobin on a nanometer-sized gold colloid modified Au electrode." Analytical Letters **35**(4): 647-661.

- Gunner, M. R., E. Alexov, et al. (1997). "The importance of the protein in controlling the electrochemistry of heme metalloproteins: methods of calculation and analysis." Journal of Biological Inorganic Chemistry **2**: 126-134.
- Guo, L. H. and H. A. O. Hill (1991). "Direct Electrochemistry of Proteins and Enzymes." Advances in Inorganic Chemistry **36**: 341-375.
- Hall, E. A. H. (1990). Biosensors. Buckingham, UK, Open University Press.
- Hall, P. L., S. W. Drew, et al. (1980). "Possible Involvement of Superoxide or Related Oxygen Species in Lignin Biodegradation." Abstracts of Papers of the American Chemical Society **180**(AUG): 155-CELL.
- Halliwell, B. (1978). "Lignin Synthesis - Generation of Hydrogen-Peroxide and Superoxide by Horseradish-Peroxidase and Its Stimulation by Manganese(Ii) and Phenols." Planta **140**(1): 81-88.
- Halthur, T. J., P. M. Claesson, et al. (2004). "Stability of polypeptide multilayers as studied by in situ ellipsometry: Effects of drying and post-buildup changes in temperature and pH." Journal of the American Chemical Society **126**(51): 17009-17015.
- Han, D., E. Williams, et al. (2001). "Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space." Biochemical Journal **353**: 411-416.
- Hanrahan, K. L., S. M. MacDonald, et al. (1996). "An electrochemical study of the interfacial and conformational behaviour of cytochrome c and other heme proteins." Electrochimica Acta **41**(15): 2469-2479.
- Hart, P. J., M. M. Balbirnie, et al. (1999). "A structure-based mechanism for copper-zinc superoxide dismutase." Biochemistry **38**(7): 2167-2178.
- He, P. L., N. F. Hu, et al. (2002). "Assembly of electroactive layer-by-layer films of hemoglobin and polycationic poly(diallyldimethylammonium)." Biomacromolecules **3**(1): 139-146.
- Hensley, K. and R. A. Floyd (2002). "Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: A look back, a look ahead." Archives of Biochemistry and Biophysics **397**(2): 377-383.
- Hiller, M., C. Kranz, et al. (1996). "Amperometric biosensors produced by immobilization of redox enzymes at polythiophene-modified electrode surfaces." Advanced Materials **8**(3): 219-226.
- Hodak, J., R. Etchenique, et al. (1997). "Layer-by-layer self-assembly of glucose oxidase with a poly(allylamine)ferrocene redox mediator." Langmuir **13**(10): 2708-2716.
- Ignatov, S., D. Shishniashvili, et al. (2002). "Amperometric biosensor based on a functionalized gold electrode for the detection of antioxidants." Biosensors & Bioelectronics **17**(3): 191-199.
- Inanami, O., T. Yamamori, et al. (2001). "ESR detection of intraphagosomal superoxide in polymorphonuclear leukocytes using 5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide." Free Radical Research **34**(1): 81-92.
- Ingold, K. U. (2003). "Reactions of water-soluble alkylperoxyl radicals and superoxide with DNA, lipoproteins and phospholipid vesicles: The role played by electrostatic forces." Current Medicinal Chemistry **10**(24): 2631-2642.
- Jaenicke, R. and C. Slingsby (2001). "Lens crystallins and their microbial homologs: Structure, stability, and function." Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology **36**(5): 435-499.
- Jin, W., U. Wollenberger, et al. (1996). "Electron transfer between cytochrome c and copper enzymes." Bioelectrochemistry and Bioenergetics **39**(2): 221-225.



- Johnson, D. L., C. J. Maxwell, et al. (2002). "The influence of promoter and of electrode material on the cyclic voltammetry of *Pisum sativum* plastocyanin." Bioelectrochemistry **58**(2): 137-147.
- Joshi, P. and P. P. Dennis (1993). "Structure, Function, and Evolution of the Family of Superoxide-Dismutase Proteins from Halophilic Archaeobacteria." Journal of Bacteriology **175**(6): 1572-1579.
- Kalka, K., H. Mukhtar, et al. (2000). "Biomelanin antioxidants in cosmetics: Assessment based on inhibition of lipid peroxidation." Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology **13**(3-4): 143-149.
- Kang, C. H., D. L. Brautigan, et al. (1978). "Definition of Cytochrome-C Binding Domains by Chemical Modification - Reaction of Carboxydinitrophenyl-Cytochromes-C and Trinitrophenyl-Cytochromes-C with Bakers-Yeast Cytochrome-C Peroxidase." Journal of Biological Chemistry **253**(18): 6502-6510.
- Kano, K. and T. Ikeda (2000). "Fundamentals and practices of mediated bioelectrocatalysis." Analytical Sciences **16**(10): 1013-1021.
- Katz, E. and I. Willner (2003). "A biofuel cell with electrochemically switchable and tunable power output." Journal of the American Chemical Society **125**(22): 6803-6813.
- Kayushina, R., Y. Lvov, et al. (1996). "Construction and X-ray reflectivity study of self-assembled lysozyme/polyion multilayers." Thin Solid Films **285**: 246-248.
- Keilin, D. (1925). "On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants." Proceedings of the Royal Society **98**: 312-339.
- Kim, N. H., M. S. Jeong, et al. (2004). "Peroxidase activity of cytochrome c." Bulletin of the Korean Chemical Society **25**(12): 1889-1892.
- Kim, S. M., W. S. Eum, et al. (1998). "The free radical-generating function of a familial amyotrophic lateral sclerosis-associated D90A Cu,Zn-superoxide dismutase mutant." Biochemistry and Molecular Biology International **46**(6): 1191-1200.
- Klug, D., I. Fridovich, et al. (1972). "Direct Demonstration of Catalytic Action of Superoxide Dismutase through Use of Pulse Radiolysis." Journal of Biological Chemistry **247**(15): 4839-4842.
- Kovacic, P. and J. D. Jacintho (2001). "Mechanisms of carcinogenesis: Focus on oxidative stress and electron transfer." Current Medicinal Chemistry **8**(7): 773-796.
- Kroning, S., F. W. Scheller, et al. (2004). "Myoglobin-clay electrode for nitric oxide (NO) detection in solution." Electroanalysis **16**(4): 253-259.
- Kuznetsov, B. A., G. P. Shumakovich, et al. (2001). "On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode." Biosensors & Bioelectronics **16**(1-2): 73-84.
- Lah, M. S., M. M. Dixon, et al. (1995). "Structure-Function in *Escherichia-Coli* Iron Superoxide-Dismutase - Comparisons with the Manganese Enzyme from *Thermus-Thermophilus*." Biochemistry **34**(5): 1646-1660.
- Lai, M. E. and A. Bergel (2002). "Direct electrochemistry of catalase on glassy carbon electrodes." Bioelectrochemistry **55**(1-2): 157-160.
- Lavelle, F., M. E. McAdam, et al. (1977). "Pulse-Radiolysis Study of Catalytic Mechanism of Iron-Containing Superoxide-Dismutase from *Photobacterium-Leiognathi*." Biochemical Journal **161**(1): 3-11.

- Laviron, E. (1978). General Expression Of The Linear Potential Sweep Voltammogram In The Case Of Diffusionsless Electrochemical Systems. J. Electroanal. Chem. **101**: 19-28.
- Lawrence, G. D. and D. T. Sawyer (1979). "Potentiometric Titrations and Oxidation-Reduction Potentials of Manganese and Copper-Zinc Superoxide Dismutases." Biochemistry **18**(14): 3045-3050.
- Lee, H., L. J. Kepley, et al. (1988). "Inorganic Analogs of Langmuir-Blodgett Films - Adsorption of Ordered Zirconium 1,10-Decanebisphosphonate Multilayers on Silicon Surfaces." Journal of the American Chemical Society **110**(2): 618-620.
- Lentner, C. (1984). Geigy Scientific Tables. Basel, Ciba Geigy Limited
- Leonard, B. E. (2001). "Changes in the immune system in depression and dementia: causal or co-incidental effects?" International Journal of Developmental Neuroscience **19**(3): 305-312.
- Li, J. H., G. J. Cheng, et al. (1996). "Direct electron transfer to cytochrome c oxidase in self-assembled monolayers on gold electrodes." Journal of Electroanalytical Chemistry **416**(1-2): 97-104.
- Li, W. J., M. Xian, et al. (2001). "Alternate deposition of horseradish peroxidase and bipolar pyridine salt on the solid surface to prepare electrocatalytically active enzyme thin film." Thin Solid Films **386**(1): 121-126.
- Li, Y. P., H. B. Cao, et al. (2005). "Direct electrochemistry of Hemoglobin immobilized on carbon paste electrode modified by carbon nanotubes." Acta Physico-Chimica Sinica **21**(2): 187-191.
- Liang, L. P. and M. Patel (2004). "Iron-sulfur enzyme mediated mitochondrial superoxide toxicity in experimental Parkinson's disease." Journal of Neurochemistry **90**(5): 1076-1084.
- Lisdat, F., B. Ge, et al. (1999). "Superoxide dismutase activity measurement using cytochrome c modified electrode." Analytical Chemistry **71**(7): 1359-1365.
- Liu, Y., Z. W. Chen, et al. (2002). "Superoxide formation and electron leak in the thyroid membrane of high plants." Free Radical Biology and Medicine **33**: S74-S74.
- Lojou, T. and P. Bianco (2004). "Buildup of polyelectrolyte-protein multilayer assemblies on gold electrodes. Role of the hydrophobic effect." Langmuir **20**(3): 748-755.
- Lotzbeyer, T., W. Schuhmann, et al. (1994). "Direct Electron-Transfer between the Covalently Immobilized Enzyme Microperoxidase Mp-11 and a Cystamine-Modified Gold Electrode." Journal of Electroanalytical Chemistry **377**(1-2): 291-294.
- Lvov, Y., G. Decher, et al. (1993). "Assembly, Structural Characterization, and Thermal-Behavior of Layer-by-Layer Deposited Ultrathin Films of Poly(Vinyl Sulfate) and Poly(Allylamine)." Langmuir **9**(2): 481-486.
- Lvov, Y., H. Haas, et al. (1994). "Successive Deposition of Alternate Layers of Polyelectrolytes and a Charged Virus." Langmuir **10**(11): 4232-4236.
- Lvov, Y. and H. Möhwald (1999). Protein Architecture: Interfacing Molecular Assemblies and Immobilization Biotechnology. New York, Marcel Dekker, Inc.
- Lvov, Y. M., Z. Q. Lu, et al. (1998). "Direct electrochemistry of myoglobin and cytochrome p450(cam) in alternate layer-by-layer films with DNA and other polyions." Journal of the American Chemical Society **120**(17): 4073-4080.
- Lvovich, V. and A. Scheeline (1997). "Amperometric sensors for simultaneous superoxide and hydrogen peroxide detection." Analytical Chemistry **69**(3): 454-462.

- Ma, H. Y., N. F. Hu, et al. (2000). "Electroactive myoglobin films grown layer-by-layer with poly(styrenesulfonate) on pyrolytic graphite electrodes." Langmuir **16**(11): 4969-4975.
- Mak, K. K. W., U. Wollenberger, et al. (2003). "An amperometric bi-enzyme sensor for determination of formate using cofactor regeneration." Biosensors & Bioelectronics **18**(9): 1095-1100.
- Mak, S. and G. E. Newton (2001). "The oxidative stress hypothesis of congestive heart failure - Radical thoughts." Chest **120**(6): 2035-2046.
- Mao, F., N. Mano, et al. (2003). "Long tethers binding redox centers to polymer backbones enhance electron transport in enzyme "wiring" hydrogels." Journal of the American Chemical Society **125**(16): 4951-4957.
- Marklund, S. (1976). "Spectrophotometric Study of Spontaneous Disproportionation of Superoxide Anion Radical and Sensitive Direct Assay for Superoxide-Dismutase." Journal of Biological Chemistry **251**(23): 7504-7507.
- Marklund, S. L. (1988). "Role of Toxic Effects of Oxygen in Reperfusion Damage." Journal of Molecular and Cellular Cardiology **20**: 23-30.
- Marshall, J. A., M. Hovenden, et al. (2002). "Photosynthesis does influence superoxide production in the ichthyotoxic alga *Chattonella marina* (Raphidophyceae)." Journal of Plankton Research **24**(11): 1231-1236.
- Mathews, F. S. (1985). "The Structure, Function and Evolution of Cytochromes." Progress in Biophysics & Molecular Biology **45**(1): 1-56.
- Mattson, M. P. (2002). Involvement of superoxide in pathogenic action of mutations that cause Alzheimer's disease. Redox Cell Biology and Genetics, Part A. **352**: 455-474.
- McCord, J. M. (2000). "The evolution of free radicals and oxidative stress." American Journal of Medicine **108**(8): 652-659.
- McCord, J. M. and Fridovich (1968). "Reduction of Cytochrome C by Milk Xanthine Oxidase." Journal of Biological Chemistry **243**(21): 5753-5761.
- McCord, J. M. and I. Fridovich (1969). "AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN)." J. Biol. Chem. **244**(22): 6049-6055.
- McKenzie, K. J. and F. Marken (2003). "Accumulation and reactivity of the redox protein cytochrome c in mesoporous films of TiO<sub>2</sub> phytate." Langmuir **19**(10): 4327-4331.
- McMunn, C. A. (1884). "On myohaematin, an intrinsic muscle-pigment of vertebrates and invertebrates, on histohaematin, and on the spectrum of the suprarenal bodies." Journal of Physiology **5**(XXIV).
- Meng, X. Y., X. Q. Wu, et al. (2001). "The electrochemical and spectroelectrochemical behaviors of SOD at cysteine modified gold electrode." Bioelectrochemistry **54**(2): 125-129.
- Mesaros, S., Z. Vankova, et al. (1998a). "Preparation and optimization of superoxide microbiosensor." Analytica Chimica Acta **358**(1): 27-33.
- Mesaros, S., Z. Vankova, et al. (1998b). "Electrochemical determination of superoxide and nitric oxide generated from biological samples." Bioelectrochemistry and Bioenergetics **46**(1): 33-37.
- Michiels, C., M. Raes, et al. (1994). "Importance of Se-Glutathione Peroxidase, Catalase, and Cu/Zn-Sod for Cell-Survival against Oxidative Stress." Free Radical Biology and Medicine **17**(3): 235-248.
- Misiaszek, R., C. Crean, et al. (2004). "Oxidative DNA damage associated with combination of guanine and superoxide radicals and repair mechanisms via radical trapping." Journal of Biological Chemistry **279**(31): 32106-32115.

- Mu, S. L. and H. G. Xue (1996). "Bioelectrochemical characteristics of glucose oxidase immobilized in a polyaniline film." Sensors and Actuators B-Chemical **31**(3): 155-160.
- Nandi, A. and I. B. Chatterjee (1987). "Scavenging of Superoxide Radical by Ascorbic-Acid." Journal of Biosciences **11**(1-4): 435-441.
- Nanni, E. J., M. D. Stallings, et al. (1980). "Does Superoxide Ion Oxidize Catechol, Alpha-Tocopherol, and Ascorbic-Acid by Direct Electron-Transfer." Journal of the American Chemical Society **102**(13): 4481-4485.
- Niculescu, M., I. Frebort, et al. (2000). "Amine oxidase based amperometric biosensors for histamine detection." Electroanalysis **12**(5): 369-375.
- Oberley, L. W. (1991). "Superoxide-Dismutase and Cancer - a Citation-Classic Commentary on Role of Superoxide-Dismutase in Cancer - a Review by Oberley,L.W. And Buettner,G.R." Current Contents/Clinical Medicine(24): 10-10.
- Oberley, L. W. and G. R. Buettner (1979). "Role of Superoxide-Dismutase in Cancer - Review." Cancer Research **39**(4): 1141-1149.
- Ohsaka, T., Y. Tian, et al. (2002). "A superoxide dismutase-modified electrode that detects superoxide ion." Chemical Communications(9): 990-991.
- Olsen, J. and L. Davis (1976). "Oxidation of Dithiothreitol by Peroxidases and Oxygen." Biochimica Et Biophysica Acta **445**(2): 324-329.
- Panchagnula, V., C. V. Kumar, et al. (2002). "Ulthathin layered myoglobin-polyion films functional and stable at acidic pH values." Journal of the American Chemical Society **124**(42): 12515-12521.
- Petri, M., D. M. Kolb, et al. (2003). "Adsorption of mercaptopropionic acid onto Au(111) - Part I. Adlayer formation, structure and electrochemistry." Electrochimica Acta **49**(1): 175-182.
- Porter, M. D., T. B. Bright, et al. (1987). "Spontaneously Organized Molecular Assemblies .4. Structural Characterization of Normal-Alkyl Thiol Monolayers on Gold by Optical Ellipsometry, Infrared-Spectroscopy, and Electrochemistry." Journal of the American Chemical Society **109**(12): 3559-3568.
- Quick, K. L., J. I. Hardt, et al. (2000). "Rapid microplate assay for superoxide scavenging efficiency." Journal of Neuroscience Methods **97**(2): 139-144.
- Rajesh, S. S. Pandey, et al. (2004). "Development of an amperometric biosensor based on a redox-mediator-doped polypyrrole film." Journal of Applied Polymer Science **93**(2): 927-933.
- Ramanavicius, A., K. Habermuller, et al. (1999). "Polypyrrole entrapped quinohemoprotein alcohol dehydrogenase. Evidence for direct electron transfer via conducting-polymer chains." Analytical Chemistry **71**(16): 3581-3586.
- Reedy, C. J. and B. R. Gibney (2004). "Heme protein assemblies." Chemical Reviews **104**(2): 617-649.
- Rhoten, M. C., J. D. Burgess, et al. (2002). "The reaction of cytochrome c from different species with cytochrome c oxidase immobilized in an electrode supported lipid bilayer membrane." Journal of Electroanalytical Chemistry **534**(2): 143-150.
- Rilling, P., T. Walter, et al. (1997). "Encapsulation of cytochrome C by multilayer microcapsules. A model for improved enzyme immobilization." Journal of Membrane Science **129**(2): 283-287.
- Rotilio, G., E. M. Fielden, et al. (1972). "Pulse Radiolysis Study of Superoxide Dismutase." Biochimica Et Biophysica Acta **268**(2): 605-613.

- Ruzgas, T., E. Csoregi, et al. (1996). "Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application." *Analytica Chimica Acta* **330**(2-3): 123-138.
- Sakurai, T. and F. Nose (1995). "Direct electrochemistry of blue copper proteins at Au electrodes modified with promoters." *Chemistry Letters*(12): 1075-1076.
- Sakurai, T., F. Nose, et al. (1996). "Reduction and oxidation processes of blue copper proteins, azurin, pseudoazurin, umecyanin, stellacyanin, plantacyanin, and plastocyanin approached by cyclic and potential step voltammetries." *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **69**(10): 2855-2862.
- Salles, B., U. Sattler, et al. (1999). "Repair of oxidative DNA damage in vitro: A tool for screening antioxidative compounds." *Food and Chemical Toxicology* **37**(9-10): 1009-1014.
- Sanders, S. P., S. J. Harrison, et al. (1994). "A Comparative-Study of Epr Spin-Trapping and Cytochrome-C Reduction Techniques for the Measurement of Superoxide Anions." *Free Radical Biology and Medicine* **16**(6): 753-761.
- Sawyer, D. T., G. Chiericato, et al. (1982). "Oxidation of Ascorbic-Acid and Dehydroascorbic Acid by Superoxide Ion in Aprotic Media." *Journal of the American Chemical Society* **104**(23): 6273-6278.
- Scheller, F. W., N. Bistolos, et al. (2005). "Thirty Years of Haemoglobin Electrochemistry." submitted.
- Scheller, F. W., U. Wollenberger, et al. (2001). "Research and development in biosensors." *Current Opinion in Biotechnology* **12**(1): 35-40.
- Scheller, W., W. Jin, et al. (1999). "Cytochrome C based superoxide sensor for in vivo application." *Electroanalysis* **11**(10-11): 703-706.
- Schuhmann, W. (1995). "Conducting polymer based amperometric enzyme electrodes." *Mikrochimica Acta* **121**(1-4): 1-29.
- Schumacher, J. T., H. J. Hecht, et al. (2001). "Direct electron transfer observed for peroxidase to screen-printed graphite electrodes." *Electroanalysis* **13**(8-9): 779-785.
- Shen, H., J. E. Mark, et al. (1997). "Blocking behavior of self-assembled monolayers on gold electrodes." *Journal of Solid State Electrochemistry* **1**(2): 148-154.
- Shleev, S., A. Christenson, et al. (2005). "Electrochemical redox transformations of T1 and T2 copper sites in native *Trametes hirsuta* laccase at gold electrode." *Biochemical Journal* **385**: 745-754.
- Shleev, S., A. El Kasmi, et al. (2004). "Direct heterogeneous electron transfer reactions of bilirubin oxidase at a spectrographic graphite electrode." *Electrochemistry Communications* **6**(9): 934-939.
- Shumyantseva, V. V., Y. D. Ivanov, et al. (2004). "Direct electron transfer of cytochrome P450B4 at electrodes modified with nonionic detergent and colloidal clay nanoparticles." *Analytical Chemistry* **76**(20): 6046-6052.
- Sohal, R. S., B. H. Sohal, et al. (1995). "Mitochondrial Superoxide and Hydrogen-Peroxide Generation, Protein Oxidative Damage, and Longevity in Different Species of Flies." *Free Radical Biology and Medicine* **19**(4): 499-504.
- Sohn, H. Y., T. Gloe, et al. (1999). "Sensitive superoxide detection in vascular cells by the new chemiluminescence dye L-012." *Journal of Vascular Research* **36**(6): 456-464.
- Solomon, E. I., M. J. Baldwin, et al. (1992). "Electronic-Structures of Active-Sites in Copper Proteins - Contributions to Reactivity." *Chemical Reviews* **92**(4): 521-542.
- Solomon, E. I., P. Chen, et al. (2001). "Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins." *Angewandte Chemie-International Edition* **40**(24): 4570-4590.

- Solomon, E. I., R. K. Szilagy, et al. (2004). "Electronic structures of metal sites in proteins and models: Contributions to function in blue copper proteins." Chemical Reviews **104**(2): 419-458.
- Song, M. I., F. F. Bier, et al. (1995). "A Method to Detect Superoxide Radicals Using Teflon Membrane and Superoxide-Dismutase." Bioelectrochemistry and Bioenergetics **38**(2): 419-422.
- Song, S., R. A. Clark, et al. (1993). "Characterization of Cytochrome-C Alkanethiolate Structures Prepared by Self-Assembly on Gold." Journal of Physical Chemistry **97**(24): 6564-6572.
- Sono, M., M. P. Roach, et al. (1996). "Heme-containing oxygenases." Chemical Reviews **96**(7): 2841-2887.
- Spector, A., R.-R. Wang, et al. (2000). "Development and Characterization of an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Resistant Immortal Lens Epithelial Cell Line." Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **41**(3): 832-843.
- Steitz, R., V. Leiner, et al. (2002). "Temperature-induced changes in polyelectrolyte films at the solid-liquid interface." Applied Physics a-Materials Science & Processing **74**: S519-S521.
- Stellwagen, E. and R. D. Cass (1975). "Complexation of Iron Hexacyanides by Cytochrome-C - Evidence for Electron Exchange at Exposed Heme Edge." Journal of Biological Chemistry **250**(6): 2095-2098.
- Stellwagen, E., R. Rysavy, et al. (1972). "Conformation of Horse Heart Apocytochrome-C." Journal of Biological Chemistry **247**(24): 8074-8077.
- Stigter, E. C. A., G. A. H. deJong, et al. (1997). "Electron transfer and stability of a quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase electrode." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **68**(1): 110-116.
- St-Pierre, J., J. A. Buckingham, et al. (2002). "Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain." Journal of Biological Chemistry **277**(47): 44784-44790.
- Subrahmanyam, V. V., P. Kolachana, et al. (1991). "Hydroxylation of Phenol to Hydroquinone Catalyzed by a Human Myeloperoxidase-Superoxide Complex - Possible Implications in Benzene-Induced Myelotoxicity." Free Radical Research Communications **15**(5): 285-296.
- Sun, D. M., C. X. Cai, et al. (2004). "Immobilization and direct electrochemistry of copper-containing enzymes on active carbon." Chinese Science Bulletin **49**(23): 2452-2454.
- Tachiiri, N., H. Hemmi, et al. (2004). "Effects of axial methionine coordination on the in-plane asymmetry of the heme electronic structure of cytochrome c." Journal of Biological Inorganic Chemistry **9**(6): 733-742.
- Tammeveski, K., T. T. Tenno, et al. (1998). "Superoxide electrode based on covalently immobilized cytochrome c: Modelling studies." Free Radical Biology and Medicine **25**(8): 973-978.
- Tan, H. L., M. J. McMurdo, et al. (2003). "Temperature dependence of polyelectrolyte multilayer assembly." Langmuir **19**(22): 9311-9314.
- Taniguchi, I., K. Toyosawa, et al. (1982). "Reversible Electrochemical Reduction and Oxidation of Cytochrome-C at a Bis(4-Pyridyl) Disulfide-Modified Gold Electrode." Journal of the Chemical Society-Chemical Communications(18): 1032-1033.

- Tarlov, M. J. and E. F. Bowden (1991). "Electron-Transfer Reaction of Cytochrome-C Adsorbed on Carboxylic-Acid Terminated Alkanethiol Monolayer Electrodes." Journal of the American Chemical Society **113**(5): 1847-1849.
- Thannickal, V. J. and B. L. Fanburg (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology **279**(6): L1005-L1028.
- Thevenot, D. R., K. Toth, et al. (2001). "Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification." Analytical Letters **34**(5): 635-659.
- Tian, Y., L. Mao, et al. (2002a). "Superoxide dismutase-based third-generation biosensor for superoxide anion." Analytical Chemistry **74**(10): 2428-2434.
- Tian, Y., M. Shioda, et al. (2002b). "A facilitated electron transfer of copper-zinc superoxide dismutase (SOD) based on a cysteine-bridged SOD electrode." Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects **1569**(1-3): 151-158.
- Todorich, B. M. and J. R. Connor (2004). Redox metals in Alzheimer's disease. Redox-Active Metals in Neurological Disorders. **1012**: 171-178.
- Trau, D. and R. Renneberg (2003). "Encapsulation of glucose oxidase microparticles within a nanoscale layer-by-layer film: immobilization and biosensor applications." Biosensors & Bioelectronics **18**(12): 1491-1499.
- Tsujimura, S., T. Nakagawa, et al. (2004). "Kinetic study of direct bioelectrocatalysis of dioxygen reduction with bilirubin oxidase at carbon electrodes." Electrochemistry **72**(6): 437-439.
- Turkova, J. (1999). "Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function." Journal of Chromatography B **722**(1-2): 11-31.
- Ukeda, H., T. Shimamura, et al. (2002). "Spectrophotometric assay of superoxide anion formed in Maillard reaction based on highly water-soluble tetrazolium salt." Analytical Sciences **18**(10): 1151-1154.
- Vanloon, A., B. Pesoldhurt, et al. (1986). "A Yeast Mutant Lacking Mitochondrial Manganese-Superoxide Dismutase Is Hypersensitive to Oxygen." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **83**(11): 3820-3824.
- Verkhovskii, M. I., G. I. Gudz, et al. (1985). "Generation of Superoxide Radicals in Electron-Transport Reactions of Bacterial Photosynthesis." Biochemistry-Moscow **50**(1): 147-150.
- Wagner, P., M. Hegner, et al. (1996). "Covalent immobilization of native biomolecules onto Au(111) via N-hydroxysuccinimide ester functionalized self-assembled monolayers for scanning probe microscopy." Biophysical Journal **70**(5): 2052-2066.
- Wang, J. (2005). "Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review." Electroanalysis **17**(1): 7-14.
- Wang, L. W. and N. F. Hu (2001). "Direct electrochemistry of hemoglobin in layer-by-layer films with poly(vinyl sulfonate) grown on pyrolytic graphite electrodes." Bioelectrochemistry **53**(2): 205-212.
- Wang, N. and Y. L. Wang (2004). "Images of azurin protein studied by AFM." Chemical Research in Chinese Universities **20**(4): 437-439.
- Wang, Y. H., J. Cui, et al. (1997). "The direct electrochemistry of cytochrome b(5) and its mutant proteins." Journal of Electroanalytical Chemistry **428**(1-2): 39-45.

- Wattanapitayakul, S. K. and J. A. Bauer (2001). "Oxidative pathways in cardiovascular disease - Roles, mechanisms, and therapeutic implications." Pharmacology & Therapeutics **89**(2): 187-206.
- Wei, J. J., H. Y. Liu, et al. (2002a). "Direct wiring of cytochrome c's heme unit to an electrode: Electrochemical studies." Journal of the American Chemical Society **124**(32): 9591-9599.
- Wei, J. J., H. Y. Liu, et al. (2002b). "Electron-transfer dynamics of cytochrome C: A change in the reaction mechanism with distance." Angewandte Chemie-International Edition **41**(24): 4700-4703.
- Wirtz, M. and M. Rivera (1999). "Direct electrochemistry of cytochromes b(5), c and P450(CAM) at an ultrasound-activated glassy carbon electrode." Abstracts of Papers of the American Chemical Society **217**: U986-U986.
- Wolin, M. S., S. A. Gupte, et al. (2002). "Superoxide in the vascular system." Journal of Vascular Research **39**(3): 191-207.
- Woods, J. R. (2001). "Reactive oxygen species and preterm premature rupture of membranes - A review." Placenta **22**: S38-S44.
- Xie, Y. W. and S. J. Dong (1992). "Effect of Ph on the Electron-Transfer of Cytochrome-C on a Gold Electrode Modified with Bis(4-Pyridyl)Disulphide." Bioelectrochemistry and Bioenergetics **29**(1): 71-79.
- Yaropolov, A. I., A. N. Kharybin, et al. (1996). "Electrochemical properties of some copper-containing oxidases." Bioelectrochemistry and Bioenergetics **40**(1): 49-57.
- Ye, B. X. and X. Y. Zhou (1997). "Direct electrochemical redox of tyrosinase at silver electrodes." Talanta **44**(5): 831-836.
- Youdim, K. A. and J. A. Joseph (2001). "A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: A multiplicity of effects." Free Radical Biology and Medicine **30**(6): 583-594.
- Zayats, M., E. Katz, et al. (2002). "Electrical contacting of glucose oxidase by surface-reconstitution of the apo-protein on a relay-boronic acid-FAD cofactor monolayer." Journal of the American Chemical Society **124**(10): 2120-2121.
- Zhang, S. X., W. W. Yang, et al. (2004). "Multilayered construction of glucose oxidase on gold electrodes based on layer-by-layer covalent attachment." Analytica Chimica Acta **523**(2): 209-217.
- Zhao, G. C., L. Zhang, et al. (2003). "Myoglobin on multi-walled carbon nanotubes modified electrode: direct electrochemistry and electrocatalysis." Electrochemistry Communications **5**(9): 825-829.