

Cytochrom c-basierter Superoxidsensor in organischen Medien

M. Beissenhertz, F.W. Scheller, F. Lisdat

Institut für Biochemie und Biologie

Analytische Biochemie, Universität Potsdam

Karl-Liebknecht-Str. 24-25, Haus 25, 14476 Golm

Registriernummer der Online-Anmeldung: 182

Poster

Das Superoxid-Radikal O_2^- ist wegen seiner toxischen Wirkung in der Medizin von grossem Interesse. Es hat sich ausserdem als geeignetes Modellsystem zur Untersuchung von Radikal-Scavengern bewährt.

Der untersuchte Sensor besteht aus an einer Goldelektrode kovalent immobilisiertem Cytochrom c und kann amperometrisch zur Bestimmung der Konzentration von Superoxid-Radikalen verwendet werden. Dies ermöglicht, die antioxidative Wirkung von Substanzen nachzuweisen, welche Superoxid-Ionen abfangen und somit die Superoxid-Konzentration im Medium verringern.

Die Methode ist in rein wässrigen Systemen etabliert.¹

Dies limitiert allerdings die Anwendung auf hydrophile Substanzen. Der Sensor kann somit nicht für die Charakterisierung der Vielzahl von antioxidativ wirksamen hydrophoben Naturprodukten, wie etwa Vitaminen, und der Bestimmung der Effektivität von kosmetischen Produkten auf Creme-Basis mit verschiedenen antioxidativen Beigaben angewendet werden.

Insbesondere die Bestimmung der Gesamt-Effektivität von kosmetischen Produkten mit verschiedenen antioxidativen Zusätzen ist hier von grossem Interesse.

Um diese Beschränkung aufzuheben und somit die Anwendungsbreite des Sensors erheblich zu erweitern, werden in der vorliegenden Arbeit die Elektrochemie von kovalent immobilisiertem Cytochrom c und das Detektionsverhalten des Sensors in nicht rein wässrigen Lösungen, d.h. in verschiedenen organischen Lösungsmitteln sowie Gemischen dieser Lösungsmittel mit wässrigem Puffer, untersucht.

¹ Lisdat, F. et al: Superoxide Dismutase Activity Measurement using Cytochrome c-modified Electrode. In: Anal. Chem. 1999, 71,1359-1365

Im etablierten Sensor wird das Cytochrom c mittels des Linkers Mercaptoundecansäure kovalent an einer Goldelektrode immobilisiert. Dessen Schwefel-Gruppe bindet an die Oberfläche der Goldelektrode; die Säurefunktion wird an Lysin-Reste des Cytochrom c kovalent gebunden.

Der Sensor beruht auf der Elektrochemie von kovalent immobilisiertem Cytochrom c sowie der Reaktion von Cytochrom c mit Superoxid-Radikalen. Hierbei findet die Übertragung eines Elektrons vom Superoxid-Radikal auf das Cytochrom, und von diesem weiter auf die Elektrode, statt. Somit wird eine einfache amperometrische Methodik ermöglicht.

Bei Verwendung einer geeigneten Superoxid-Quelle, wie etwa dem Enzym Xanthin-Oxidase, welches Superoxid als Nebenprodukt bei der Umwandlung von Hypoxanthin zu Harnsäure freisetzt, bewirkt die Zugabe potentiell antioxidativer Substanzen eine Abnahme der Superoxid-Konzentration in der Messzelle.

Messung und Auswertung können somit online an einem vergleichsweise unkomplizierten Messplatz durchgeführt werden. Dieses Verfahren kann quantitativ zur Charakterisierung der antioxidativen Wirkung der untersuchten Substanz verwendet werden und ermöglicht so einen Vergleich der Effektivität verschiedener Antioxidantien.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals das quasi-reversible Verhalten von kovalent immobilisiertem Cytochrom c in nicht rein wässrigen Systemen nachgewiesen. Untersucht wurden dabei Gemische wie zum Beispiel Butandiol/Natrium-Phosphat-Puffer mit einem organischen Lösungsmittelanteil von 10% v/v bis zu 70% v/v.

Der Einfluss des Anteils an organischem Lösungsmittel auf das Redoxverhalten des Proteins, die Kinetik der Redoxumwandlung und die Stabilität des Sensors wurden ermittelt.

Messreihen mit variierendem Anteil organischen Lösungsmittels wurden neben dem assemblierten Sensor auch mit gelöstem Cytochrom c an einer mit dem Promoter Mercaptoundecansäure modifizierten Goldelektrode durchgeführt, um den Einfluss der Immobilisierung bzw. der Promoterschicht auf die mit dem Lösungsmittelanteil variierenden elektrochemischen Eigenschaften zu klären.

Das quasi-reversible Verhalten des Sensors auch in Gemischen mit mehr als 50% Volumen- Anteil an organischem Lösungsmittel und die dabei ermittelten kinetischen Parameter legen nahe, dass unter der Voraussetzung einer geeigneten Superoxid-Quelle das Messen von

Superoxid-Konzentrationen auch in Gemischen aus wässrigem Puffer mit organischen Lösungsmitteln möglich sein sollte.

Geeignete Superoxidquellen sind die Xanthinoxidase-katalysierte Reaktion, die auch in organischen Lösungsmitteln abläuft, und Kalium-Superoxid, das ebenfalls in organischen Medien löslich ist.

Mit diesen Arbeiten sind wesentliche Grundlagen für die Charakterisierung der antioxidativen Wirkung von hydrophoben Substanzen aus Natur und Kosmetik mit dem angegebenen System gelegt. Dies stellt eine enorme Erweiterung der Einsatzmöglichkeiten des Sensorsystems dar.