

Photokatalyse

DOI: 10.1002/ange.200503084

Nanohybride aus Quantenpunkten und Cytochrom P450 als Photokatalysatoren**

Binil Itty Ipe und Christof M. Niemeyer*

Halbleiter-Nanomaterialien, wie Quantenpunkte (Quantum Dots, QDs), Quantenstäbe (Quantum Rods, QRs) und Nanoröhren, haben ein großes Anwendungspotenzial für Gebiete von der Nanoelektronik^[1] und Nanophotonik bis hin zur Nanosensorik^[2–7] und zum Bioimaging.^[8,9] Darüber hinaus machen ihre aus der räumlichen Einschränkung der enthaltenen Elektronen resultierenden, ungewöhnlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften diese Nanomaterialien zu attraktiven Kandidaten für die Herstellung neuartiger Funktionseinheiten für die Energietechnologie.^[10] Beispielsweise wurden für die Entwicklung von Solarzellen die Lichtabsorptionseigenschaften und das Auftreten von Elektronentransferreaktionen an der Grenzfläche zwischen der Halbleiteroberfläche und Flüssigphasen intensiv untersucht.^[11] Auch die photokatalytische Aktivität von Halbleiter-QDs wird seit deren erstmaliger Beschreibung^[12] umfassend erforscht. Dies hat bereits zur Entwicklung von organischen Reaktionen geführt, bei denen Halbleitermaterialien als Photosensibilisatoren verwendet werden.^[13–17]

Gegenwärtig werden Nanotechnologie und Biotechnologie miteinander vereint, um so neuartige Materialien und Funktionseinheiten zu entwickeln; dieses noch junge, interdisziplinäre Feld wird als Nanobiotechnologie bezeichnet.^[18] Wir berichten hier über eine photoaktivierte organische Umsetzung, die durch hybride Nanopartikel aus Halbleiter-QDs und dem Enzym Cytochrom P450_{BSB} katalysiert wird. P450_{BSB} gehört zur großen Enzymklasse der Monooxygenasen, die eine Vielzahl regio- und stereospezifischer Sauerstoff-Insertionsreaktionen diverser organischer Substrate katalysieren.^[19] So katalysiert P450_{BSB} die Hydroxylierung

langketiger Fettsäuren in der α - und β -Position mit Wasserstoffperoxid.^[20]

Die Wahl dieses Hybridsystems basierte einerseits auf dem Wissen, dass Radikalspezies im katalytischen Zyklus der P450-vermittelten Reaktionen eine wichtige Rolle spielen,^[21–23] und andererseits auf den Ergebnissen früherer Studien. Diese hatten gezeigt, dass die Bestrahlung von CdS-QDs zur Bildung von Excitonen (e^- und h^+) führt, die ihrerseits freie Superoxid(O_2^-)- und Hydroxyl(OH^-)-Radikale in wässrigen Lösungen erzeugen.^[24–26] Wir vermuteten, dass die Superoxid- und Hydroxylradikale auf der QD-Oberfläche adsorbierende P450-Enzyme aktivieren und hierdurch eine spezifische Monooxygenierung geeigneter Substrate bewirken könnten. Eine solche Photoaktivierung von Enzymen könnte deutliche Vorteile gegenüber der herkömmlichen Aktivierung durch H_2O_2 haben, da die lichtinduzierte Reaktion bessere Möglichkeiten zur Steuerung des An- und Abschaltens der chemischen Reaktivität bieten würde, als dies bei chemisch initiierten Reaktionen der Fall ist.

Zur Herstellung der QD-P450_{BSB}-Nanohybride überexprimierten wir rekombinantes P450_{BSB}, das am C-Terminus mit einer $6 \times$ His-Sequenz modifiziert war, in *E. coli* und reinigten das Enzym durch Ni-Nitritotriacetat(NTA)-Chromatographie. Mercaptoessigsäure-stabilisierte CdS-Nanopartikel mit einem Durchmesser von ca. 3 nm wurden wie zuvor beschrieben^[24] in einem revers-micellaren Medium synthetisiert. Das P450_{BSB}-Enzym wurde mittels elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen der positiv geladenen Hexahistidin-Sequenz des Proteins und den negativ geladenen Mercaptoessigsäure-Liganden der CdS-QDs an die Nanopartikel adsorbiert (Abbildung 1).

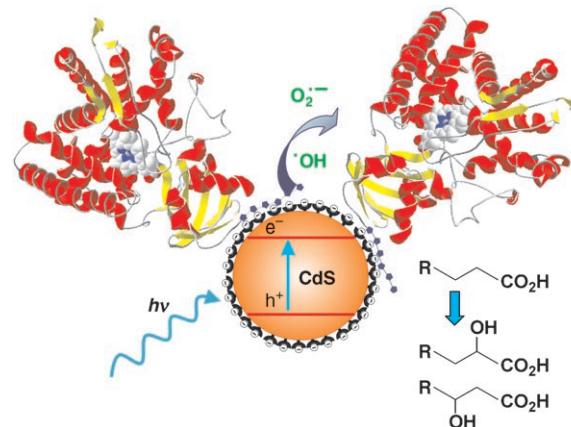


Abbildung 1. Monooxygenierung von Myristinsäure ($R = H_3C(CH_2)_{10}$) durch die P450_{BSB}-QD-Nanohybride.

Im Zuge der Präparation der QD-P450_{BSB}-Hybride wurde die Zahl der pro QD adsorbierten P450_{BSB}-Moleküle durch Untersuchung der FRET-Lösung zwischen dem CdS (Donor) und dem Häm-Enzym (Acceptor) quantifiziert (FRET = resonanter Fluoreszenzenergietransfer). Hierzu wurden sukzessive definierte Volumina des $6 \times$ His-haltigen P450_{BSB} zu einer Stammlösung der CdS-QDs titriert und die Veränderung der Fluoreszenzintensität bei 550 nm gemessen. Analog war kürzlich vorgegangen worden, um die Wechsel-

[*] Dr. B. I. Ipe, Prof. Dr. C. M. Niemeyer
Biologisch-Chemische Mikrostrukturtechnik
Fachbereich Chemie, Universität Dortmund
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)
und
ISAS – Institute for Analytical Sciences
Bunsen-Kirchhoff-Straße 11, 44139 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-755-7082
E-mail: christof.niemeyer@uni-dortmund.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Alexander von Humboldt-Stiftung (Research Fellowship für B.I.I.) unterstützt. Wir danken Dr. Isamu Matsunaga für die Überlassung des Plasmids pQE-30tBSb zur Überexpression von rekombinantem P450, Andreas Arndt für experimentelle Hilfe bei der Überexpression und Dr. Ljiljana Fruk für ihre Hilfe bei der Entwicklung des HPLC-Assays.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

wirkung zwischen CdSe-QDs und Cytochrom *c* zu untersuchen.^[27] Die Konzentration von P450_{BSP} wurde durch differentielle CO-Absorptionsuntersuchungen^[28] und jene der CdS-QDs aus „inductively coupled plasma (ICP) mass spectrometry“-Messungen bestimmt.^[24] Abbildung 2 A zeigt ty-

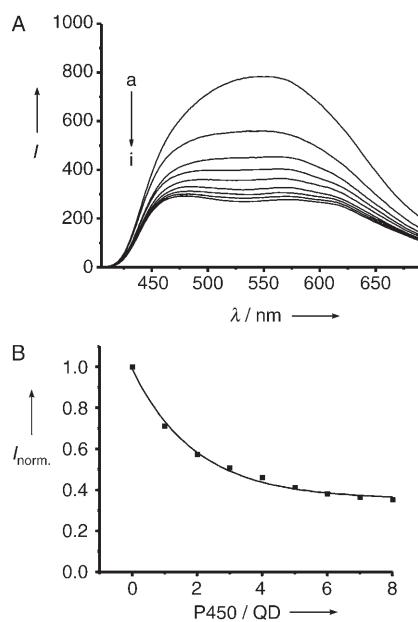


Abbildung 2. A) Photolumineszenzlösung von CdS-QDs in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen des 6 × His-P450_{BSP}-Enzyms. [CdS]/[P450_{BSP}]-Verhältnis: a) 1:0, b) 1:1, c) 1:2, d) 1:3, e) 1:4, f) 1:5, g) 1:6, h) 1:7, i) 1:8. B) Lumineszenzlösung bei 540 nm durch die Bildung der Biokonjugate bei steigenden Verhältnissen von P450_{BSP}/CdS. Die Daten wurden gegen unkonjugierte QDs normalisiert.

pische Fluoresenzspektren der QD-P450_{BSP}-Nanohybride. Jedes Einzelspektrum repräsentiert ein bestimmtes Mischungsverhältnis von QDs mit unterschiedlichen Mengen an P450_{BSP}. Die Abnahme der Fluoreszenzemission der CdS-QDs bei 550 nm während der Titration mit P450_{BSP} ist in Abbildung 2B gezeigt. Es ist deutlich erkennbar, dass die Intensität der QD-Fluoreszenz bis hin zu etwa sechs Moläquivalenten P450_{BSP} pro QD kontinuierlich abnimmt. Diese Belegungsdichte korreliert mit theoretischen Abschätzungen auf der Basis der Größen der QDs und des Enzyms (siehe Hintergrundinformationen). Die leichte Abnahme der QD-Fluoreszenz bei weiterer Erhöhung der P450_{BSP}-Konzentration könnte auf vom Lösungsmittel ausgehenden Löscheffekten beruhen.^[29]

Für die erstmalige Demonstration einer durch QD-P450_{BSP}-Nanohybride vermittelten Photokatalyse wählten wir als Modellreaktion die sehr gut untersuchte Hydroxylierung von Myristinsäure^[21] und prüften mittels HPLC- und LC/ESI-MS-Analytik, ob Hydroxymyristinsäure-Produkte gebildet werden. Hierzu wurde eine Lösung von Myristinsäure (8 mM) in EtOH zu einer Lösung der P450_{BSP}-QD-Hybride (20 μM) gegeben und diese Mischung 20 Minuten bei Raumtemperatur bestrahlt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit Chloroform extrahiert, und die Produkte wurden mittels LC/ESI-MS analysiert. Hierbei wurden die charakteristischen

Massenpeaks der Hydroxymyristinsäure gefunden ($[M-H^+]=243.09$, berechnet $M=244.37$, siehe Hintergrundinformationen). Keine Produktsignale wurden dagegen in folgenden Kontrollexperimenten beobachtet: 1) Bestrahlung reiner QDs in Abwesenheit von P450_{BSP}; 2) Bestrahlung von reinem P450_{BSP} in Abwesenheit von QDs; 3) keine Bestrahlung.

Wir konnten auch kleine Änderungen in der optischen Absorption von P450_{BSP} in Gegenwart des Myristinsäure-Substrates beobachten. So wurde eine Blauverschiebung um etwa 5 nm der Absorption bei 417 nm im Falle von CdS-QD-gebundenem P450_{BSP} (Abbildung S5B in den Hintergrundinformationen) und eine Blauverschiebung um etwa 3 nm im Falle von freiem P450_{BSP} (Abbildung S5A) beobachtet, wenn Myristinsäure zugegen war. Eine solche Blauverschiebung gilt als Indiz für die Bindung des Substrates an das aktive Zentrum von P450.^[22,30] Wenngleich eine solche Bindung des Substrates für Elektronentransferreaktionen nicht zwingend erforderlich ist,^[31] legen die spektroskopischen Befunde und das Ausbleiben der Produktbildung bei Abwesenheit von P450_{BSP} nahe, dass die Myristinsäure tatsächlich über die aktiven Zentren der P450-Enzyme in den CdS-P450_{BSP}-Nanohybriden umgesetzt wird.

Zur weiteren Untersuchung dieses Hybridsystems führten wir systematische Ausbeutebestimmungen mit einem standardisierten Enzymtest durch, der auf der Veresterung der gebildeten Hydroxyfettsäuren und der Verwendung von Hydroxylaurinsäure als internem Quantifizierungsstandard beruht.^[21] Eine detaillierte Vorschrift für diesen Test ist in den Hintergrundinformationen beschrieben. Wir führten eine Reihe von Experimenten durch, bei denen die Bestrahlungszeit und die Oberflächenbeladung der CdS-QDs mit unterschiedlichen Mengen an P450_{BSP} variiert wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass bei der P450_{BSP}-CdS-Photokatalyse sowohl das α- wie auch das β-Isomer der Hydroxymyristinsäure in etwa gleichen Anteilen gebildet werden, wie dies auch in der durch H₂O₂ initiierten Reaktion beobachtet wird.^[20] Erwartungsgemäß stieg der Anteil an Hydroxylierungsprodukten mit steigender Oberflächenbeladung der QDs mit P450 (Abbildung 3A) sowie mit steigender Bestrahlungszeit (Abbildung 3B).

Zur weiteren Untersuchung der P450-Enzymaktivität führten wir Kontrollreaktionen mit einem binären System durch, das neben unkonjugierten CdS-QDs ein P450_{BSP} enthielt, dem die 6 × His-Sequenz fehlte. Dieses System erzeugte unter den Standardbedingungen etwa gleiche Mengen an Hydroxylierungsprodukten wie die P450_{BSP}-CdS-Nanohybride (Abbildung S7). Diese Beobachtung stellte die Hypothese infrage, dass die enge Nachbarschaft der zwei Komponenten in den P450_{BSP}-CdS-Nanohybriden tatsächlich vorteilhaft für die katalytische Aktivität des Systems ist. Zur Abschätzung etwaiger Nachbarschaftseffekte verglichen wir die Umsatzzahlen der P450_{BSP}-CdS-Nanohybride mit denen des nativen Enzyms unter H₂O₂-Aktivierung. Hierbei wurde die Umsatzzahl des P450_{BSP}-CdS-Systems zu 61 min^{-1} und die von P450 mit H₂O₂ zu 122 min^{-1} bestimmt. Der zweite Wert ist noch etwa sechsmal kleiner als die literaturbekannte Umsatzzahl einer ähnlichen P450_{BSP}-Katalyse (363 min^{-1}). Daher zeigen diese Ergebnisse klar, dass die Aktivität von P450_{BSP} in

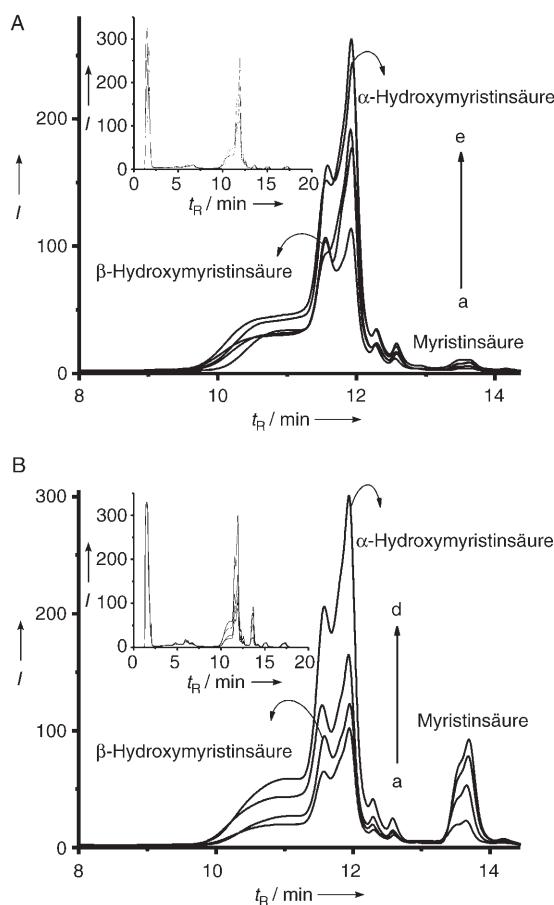


Abbildung 3. HPLC-Analyse der Monooxygenierungsprodukte von Myristinsäure. A) Unterschiedliche Beladungsverhältnisse CdS/P450_{BSP}: a) 1:1, b) 1:2, c) 1:3, d) 1:4, e) 1:5. B) Veränderung der Bestrahlungszeit: a) 1 min, b) 2 min, c) 5 min, d) 10 min. Die Einschübe zeigen die vollständigen Chromatogramme. Die linke Schulter des aufgespaltenen Produktpeaks (Retentionszeit $t_R = 11.5$ min) repräsentiert das β - und der rechte Teil ($t_R = 11.9$ min) das α -Isomer der Hydroxymyristinsäure. Der Peak bei $t_R = 13.6$ min stammt von Myristinsäure. Die breite Schulter ($t_R = 10.8$ min) resultiert aus einem HPLC-Artefakt durch das Auftragen großer Injektionsvolumina (25 μ L); siehe hierzu auch Abbildung S6.

den Nanohybriden deutlich geringer als die des nativen Enzyms ist. Dies dürfte auf negative Einflüsse der Enzymgebundenen Partikeloberfläche zurückzuführen sein, die aus der Verlangsamung von Diffusionsprozessen, der Einschränkung von Konformationsfreiheitsgraden oder der partiellen Denaturierung der Enzyme resultieren. Die P450_{BSP}-CdS-Nanohybride produzierten aber ungeachtet der verringerten Umsatzzahlen ähnliche Mengen an Hydroxylierungsprodukten wie das native Enzym. Daher können diese Ergebnisse als Hinweis gewertet werden, dass die unmittelbare Nähe des Enzyms zur QD-Oberfläche die katalytische Leistungsfähigkeit der P450_{BSP}-CdS-Nanohybride im Vergleich zu der des binären Systems positiv beeinflusst.

Zur weiteren Untersuchung der P450_{BSP}-CdS-Photokatalyse wurden Hydroxylierungsexperimente in Gegenwart des Enzyms Superoxid-Dismutase (SOD) durchgeführt. SOD zersetzt effektiv Superoxidradikale, und wir hatten diese Reaktivität zuvor genutzt, um die Identität von O₂^{•-}-Radikale

nachzuweisen, die durch Bestrahlung von CdS-QDs erzeugt werden.^[24] Für das hier untersuchte P450_{BSP}-CdS-System beobachteten wir in Gegenwart von SOD eine deutliche Abnahme der Hydroxymyristinsäure-Produkte bis hin zu etwa 20 % der ursprünglichen Ausbeute (Abbildung S8). Bei analogen Experimenten mit dem binären Zweikomponentensystem aus unkonjugierten CdS-QDs und P450_{BSP} ohne 6 × His-Sequenz nahmen die Hydroxymyristinsäure-Produkte auf etwa 10 % der ursprünglichen Werte ab. Auch diese Ergebnisse deuten auf positive Nachbarschaftseffekte in den P450_{BSP}-CdS-Nanohybridien hin. Anscheinend verringert die unmittelbare Nähe der P450-Enzyme zur QD-Oberfläche das Ausmaß der SOD-vermittelten Radikalabbaureaktion. Die Ergebnisse lassen aber auch darauf schließen, dass die Diffusion der Radikale und ihre Zersetzung durch SOD deutlich schneller sind als die Aufnahme und Umsetzung der Radikale durch die P450-Enzyme.

Wir haben hier über Quantenpunkt-Enzym-Nanohybride berichtet, die in der Lage sind, eine organische Umsetzung über die Photoaktivierung von QDs zu katalysieren. Dabei erzeugen die photogenerierten Excitonen (e⁻ und h⁺) O₂^{•-}- und/oder OH⁻-Radikale, die ihrerseits die P450-Enzyme für die katalytische Monooxygenierung von Fettsäuresubstraten aktivieren. Hierdurch wird die Myristinsäure zu α - und β -Hydroxymyristinsäure hydroxyliert. Wir konnten die chemische Zusammensetzung und die katalytische Aktivität der neuen P450_{BSP}-CdS-Nanohybride bereits klar demonstrieren, allerdings bedarf die detaillierte Charakterisierung ihrer kinetischen Eigenschaften noch zusätzlicher Untersuchungen. Weitere Arbeiten werden sich deshalb insbesondere mit Nachbarschaftseffekten befassen, die aus der Nähe der Enzyme zur radikalergenenden Partikeloberfläche resultieren könnten. Grundsätzlich bietet das lichtinduzierte Auslösen der Enzymaktivität einen Vorteil gegenüber der Kontrolle einer Enzymreaktion durch chemische Initiierung. Darüber hinaus sollten die P450_{BSP}-CdS-Nanohybride auch die Wiedergewinnung des Katalysators ermöglichen.^[32] Derzeit beschäftigen wir uns mit der Untersuchung von Nanopartikeln aus anderen Halbleitermaterialien zur Verbesserung der katalytischen Aktivität solcher Hybridsysteme sowie mit der Ausweitung des vorgestellten Konzeptes auf die Anwendung der Hybride als Photokatalysatoren für die präparative organische Chemie sowie als Photosensibilisatoren für intrazelluläre Reaktionen.

Eingegangen am 30. August 2005,
veränderte Fassung am 14. Oktober 2005
Online veröffentlicht am 19. Dezember 2005

Stichwörter: Enzyme · Nanostrukturen · Photochemie · Quantenpunkte · Radikale

- [1] T. Mokari, E. Rothenberg, I. Popov, R. Costi, U. Banin, *Science* **2004**, *304*, 1787.
- [2] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4254; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128.
- [3] E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6166; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6042.

- [4] L. Pavesi, L. D. Negro, C. Mazzoleni, G. Franzco, F. Priolo, *Nature* **2000**, *408*, 440.
- [5] A. V. Malko, A. A. Mikhailovsky, M. A. Petrusca, J. A. Hollingsworth, H. Htoon, M. G. Bawendi, V. I. Klimov, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *81*, 1303.
- [6] J. M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* **1998**, *281*, 2013.
- [7] I. Willner, F. Patolsky, J. Wasserman, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1913; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1861.
- [8] W. C. W. Chan, S. Nie, *Science* **1998**, *281*, 2016.
- [9] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Science* **2005**, *307*, 538.
- [10] F. Raimondi, G. G. Scherer, R. Kotz, A. Wokaun, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2228; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2190.
- [11] M. Grätzel, *Energy Resources through Photochemistry and Catalysis*, Academic Press, New York, **1983**.
- [12] M. A. Fox, *Acc. Chem. Res.* **1983**, *16*, 314.
- [13] S. Marinkovic, N. Hoffmann, *Chem. Commun.* **2001**, 1576.
- [14] S. Marinkovic, N. Hoffmann, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 3102.
- [15] M. Warrier, M. K. F. Lo, H. Monbouquette, M. A. Garcia-Garibay, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 859.
- [16] M. L. Curri, A. Agostiano, G. Leo, A. Mallardi, P. Cosma, M. D. Monica, *Mater. Sci. Eng. C* **2002**, *22*, 449.
- [17] I. N. Aleksey, I. A. Shumilin, V. V. Nikandrov, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 17544.
- [18] C. M. Niemeyer, C. A. Mirkin, *Nanobiotechnology: Concepts, Methods and Application*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [19] H. Waldmann, K. Drauz, *Enzymes Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, **2002**.
- [20] I. Matsunaga, A. Ueda, N. Fujiwara, T. Sumimoto, K. Ichihara, *Lipids* **1999**, *34*, 841.
- [21] I. Matsunaga, A. Ueda, T. Sumimoto, K. Ichihara, M. Ayata, H. Ogura, *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *394*, 45.
- [22] D.-S. Lee, A. Yamada, H. Sugimoto, I. Matsunaga, H. Ogura, K. Ichihara, S.-i. Adachi, S.-Y. Park, Y. Shiro, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 9761.
- [23] Eine detaillierte Beschreibung der möglichen Katalysewege ist in den Hintergrundinformationen zu finden.
- [24] B. I. Ipe, M. Lehnig, C. M. Niemeyer, *Small* **2005**, *1*, 706.
- [25] J. R. Harbour, M. L. Hair, *J. Phys. Chem.* **1977**, *81*, 1791.
- [26] A. Henglein, *Ber. Bunsen-Ges.* **1982**, *86*, 301.
- [27] I. Geissbuehler, Dissertation, EPFL (Lausanne), **2005**.
- [28] T. Omura, R. Sato, *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 2370.
- [29] E. R. Goldman, I. L. Medintz, J. L. Whitley, A. Hayhurst, A. R. Clapp, T. Uyeda, J. R. Deschamps, M. E. Lassman, H. Mattossi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6744.
- [30] I. Matsunaga, A. Yamada, D.-S. Lee, E. Obayashi, N. Fujiwara, K. Kobayashi, H. Ogura, Y. Shiro, *Biochemistry* **2002**, *41*, 1886.
- [31] F. P. Guengerich, W. W. Johnson, *Biochemistry* **1997**, *36*, 14741.
- [32] Aus der Beobachtung, dass die kontinuierliche 20-minütige Bestrahlung weder zur Präzipitation noch zu einer Reduzierung der enzymatischen Umsatzzahl führt, lässt sich eine ausreichende Stabilität der P450_{BSB}-CdS-Nanohybide abschätzen. Bisher gelang jedoch keine Wiederverwendung der Nanohybide für weitere Katalysezyklen. Vermutlich liegt dies an der Denaturierung der Enzyme während der Extraktions- und Aufarbeitungsschritte.