

Institut für Biochemie und Biologie  
Analytische Biochemie

---

**Entwicklung biohybrider Redoxsysteme auf der Grundlage  
„smarter“ Redoxpolymere**

**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  
Birgit Nagel**

**Potsdam, August 2009**

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2010/4142/>  
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-41424>  
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-41424>

*Für Jannik, Jule und Jakob*



*Der Weg ist das Ziel.*

---

KONFUZIUS



---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	ALLGEMEINER ÜBERBLICK.....	1
1.2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	3
1.2.1	<i>Biohybride Redoxsysteme .....</i>	<i>3</i>
1.2.2	<i>Redoxreaktionen .....</i>	<i>8</i>
1.2.3	<i>Redoxpolymere .....</i>	<i>14</i>
1.2.4	<i>Chemisch-modifizierte Elektroden .....</i>	<i>27</i>
<b>2.</b>	<b>ZIELSTELLUNG.....</b>	<b>31</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>35</b>
3.1	POLYMERSYNTHESEN UND -CHARAKTERISIERUNGEN.....	35
3.1.1	<i>Allgemeines.....</i>	<i>35</i>
3.1.2	<i>Kopplungsgruppen.....</i>	<i>39</i>
3.1.3	<i>Ferrocen-Polymere .....</i>	<i>41</i>
3.1.4	<i>1,10-Phenanthrolin-5,6-dion-Polymere .....</i>	<i>49</i>
3.1.5	<i>4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenon-Polymere .....</i>	<i>62</i>
3.1.6	<i>Zusammenfassung Polymere .....</i>	<i>68</i>
3.2	KONTAKTIERUNG VON OXIDOREDUKTASEN MIT SCHALTBAREN REDOXPOLYMEREN.....	70
3.2.1	<i>Allgemeines.....</i>	<i>70</i>
3.2.2	<i>Kontaktierung der Oxidoreduktasen mit den Redoxpolymeren.....</i>	<i>71</i>
3.2.3	<i>Kompetitiver Immunoassay.....</i>	<i>76</i>
3.2.4	<i>Zusammenfassung.....</i>	<i>80</i>
3.3	SCHALTBARE BIOHYBRIDE REDOXSYSTEME .....	82
3.3.1	<i>PNIPAMFoxy.....</i>	<i>82</i>
3.3.2	<i>PEGMA-Fc-SH und PEGMA-Fc-SS.....</i>	<i>84</i>
3.3.3	<i>Zusammenfassung.....</i>	<i>89</i>
<b>4.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>91</b>
<b>5.</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>95</b>
<b>6.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>97</b>
6.1	MATERIAL.....	97
6.2	LÖSUNGEN .....	98

---

6.3	METHODEN .....	98
6.4	ELEKTROCHEMISCHE MESSUNGEN .....	101
6.4.1	<i>Elektrodenvorbereitung</i> .....	101
6.4.2	<i>Elektrodenmodifizierung</i> .....	101
6.4.3	<i>Cyclische Voltammetrie und Square-Wave-Voltammetrie</i> .....	101
6.4.4	<i>Amperometrie</i> .....	101
6.5	POLYMERSYNTHESEN .....	102
6.5.1	<i>Monomere</i> .....	102
6.5.2	<i>PNIPAM-Polymersynthesen</i> .....	106
6.5.3	<i>PEGMA-Polymersynthesen</i> .....	107
6.5.4	<i>Umsetzung der Ligand-Polymere mit dem RuPD-Komplex</i> .....	109
6.6	ENZYMATISCHE METHODEN .....	109
6.6.1	<i>Rekonstituierung der PQQ-GDH</i> .....	109
6.6.2	<i>Enzymaktivität</i> .....	109
6.6.3	<i>Elektrochemische Bestimmungen</i> .....	110
6.7	IMMUNOLOGISCHE METHODEN .....	110
6.7.1	<i>Enzym-Antikörper-Konjugation</i> .....	110
6.7.2	<i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i> .....	111
6.7.3	<i>ELISA</i> .....	112
<b>7.</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>113</b>
	<b>ANHANG</b> .....	<b>123</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Allgemeiner Überblick

In vielen Bereichen des alltäglichen Lebens besteht ein Bedarf an der Bestimmung der detaillierten Zusammensetzung, wie z.B. von Trink- oder Abwasser oder des Bodens, der Lebensmittel oder des Bluts. Die Vielfalt der eingesetzten Methoden erstreckt sich von der Chromatographie über mikrobiologische Tests bis hin zu Biosensoren. So vielseitig wie die Einsatzbereiche sind, so verschieden sind auch die Anforderungen an diese Methoden.

Das Haupteinsatzgebiet von Biosensoren liegt in der Medizin. Die patientennahe Diagnostik (Point-of-Care-Testing) für die Diabetes-Kontrolle bestreitet dabei den größten Anteil. Aber auch in der Biotechnologie, Umweltanalytik und Bioabwehr werden Biosensoren eingesetzt. Die Hauptanforderungen an Biosensoren sind demnach: eine hohe Selektivität sowie Sensitivität gegenüber dem Analyten, kurze Ansprechzeiten, Reproduzierbarkeit in Sensorherstellung und der Ergebnisse, Stabilität und Lebensdauer.

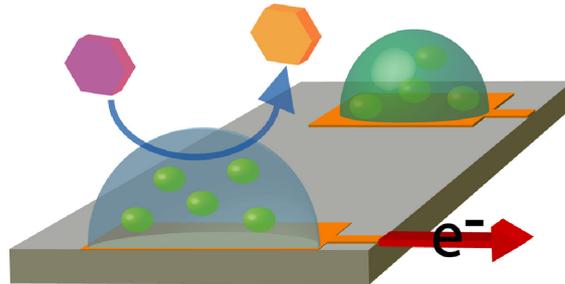
Für die elektrochemische Detektion eines Substratumsatzes durch ein redoxaktives Enzym müssen die Elektronen an eine Elektrode, anstelle eines natürlichen Elektronenakzeptors, übertragen werden. Dieser Elektronentransfer erfolgt allerdings nur dann direkt, wenn das aktive Zentrum des Enzyms für die Elektrode zugänglich ist. Aber auch die übrigen Oxidoreduktasen können für die Analytik nutzbar gemacht werden, mit so genannten Mediatoren, die Elektronen vom Enzym zur Elektrode transportieren. Diese Mediatoren können in frei beweglicher oder immobilisierter Form eingesetzt werden. Die Möglichkeiten der Immobilisierung sind vielfältig und können reversibel oder irreversibel sein. Die irreversible Integration des Mediators verhindert ein Ausbluten dieses mit fortschreitendem Einsatz. Eine Immobilisierung der Mediatoren ermöglicht den Aufbau stabiler, „reagenzloser“ Sensoren, d.h. es müssen der Probe keine weiteren Substanzen zugesetzt werden.

Die Immobilisierung der Mediatoren in Redoxpolymeren bietet zum einen den Vorteil der Oberflächenvergrößerung, womit die Mediatormenge im Vergleich zu Monoschichten deutlich gesteigert werden kann. Zum anderen kann das Polymer die natürliche Umgebung des Enzyms nachahmen sowie zum Einschluss des Enzyms dienen. Der Einsatz von Hydrogelen, also wasserbindenden Polymeren, unterstützt die Interaktion, da Enzyme in der Regel hydrophile Umgebungen bevorzugen.

In der Vergangenheit wurden die Redoxpolymere vorwiegend über Adsorption, Elektropolymerisation oder durch Integration in Kohlenstoffpaste-Elektroden immobilisiert.

Eine irreversible Immobilisierung der Polymere mit kovalent integrierten Mediatormolekülen durch einfache Prozesse sollte die Stabilität und Reproduzierbarkeit der hergestellten Sensoren erhöhen. Der Trend geht weiterhin in Richtung Elektrodenarrays, in denen

mehrere Parameter parallel bestimmt werden können (Abb. 1), d.h. eine Probe wird gleichzeitig auf unterschiedliche Sensorensports gegeben. Durch die Verwendung „smarter“, also intelligenter Redoxpolymere kann eine aufwendige Herstellung von Elektrodenarrays mit einzeln ansprechbaren Elektroden entfallen und trotzdem einzeln ansprechbare Arraysports erreicht werden.



**Abb. 1** Schematische Darstellung eines Enzybiosensors in Parallelanordnung

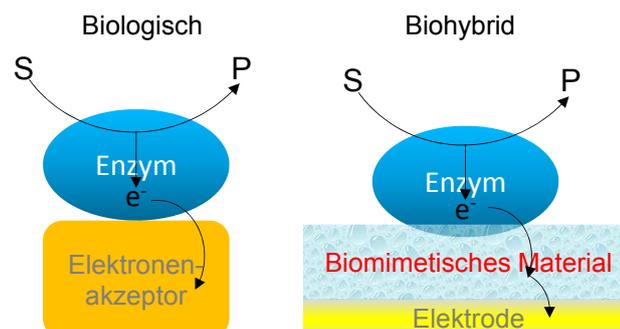
## 1.2 Theoretische Grundlagen

### 1.2.1 Biohybride Redoxsysteme

Der lateinische Ausdruck *Hybrid* bedeutet im Deutschen "zweierlei Herkunft, ein aus unterschiedlichen Arten oder Prozessen zusammengesetztes Ganzes".<sup>[1]</sup> Die zusammengebrachten Elemente stellen für sich Lösungen dar, durch das Vereinen entstehen neue, gewünschte Eigenschaften. Biohybride Systeme werden aufgrund des Wissens um biologische Funktionen gestaltet. Die Entwicklung geeigneter, die Natur nachahmender, „biomimetischer“ Materialien oder Prozesse wird zum Aufbau dieser Systeme herangezogen.<sup>[2]</sup>

Die „*Biomimetik*“ oder auch „*Bionik*“ (Biologie + Technik) entschlüsselt „Erfindungen der Natur“ und setzt die Muster nach Aufbereitung und kleinen Modifizierungen in die Technik um.<sup>[3, 4]</sup> Beispiele für biomimetische Prinzipien im alltäglichen Leben sind etwa das Echolot (Delfine), Fassadenfarbe mit Lotuseffekt (Lotus *Nelumbo*) oder der Klettverschluss (Große Klette *Arctium lappa*).

Ein wichtiges Teilgebiet sind biohybride Redoxsysteme, Kombinationen aus Biokomponenten, wie Enzymen, Antikörpern oder Zellen, und Elektronentransfer(ET)-Systemen. Materialien mit biomimetischen Eigenschaften bilden die Schnittstelle zwischen der nativen und artifiziellen Komponente (Abb. 2). Daraus entstehen biohybride Redoxsysteme. Die Übertragung der Elektronen wird auf artifizielle, „maßgeschneiderte“ Moleküle oder Elektroden, anstatt auf die natürlichen Elektronenakzeptoren gelenkt.



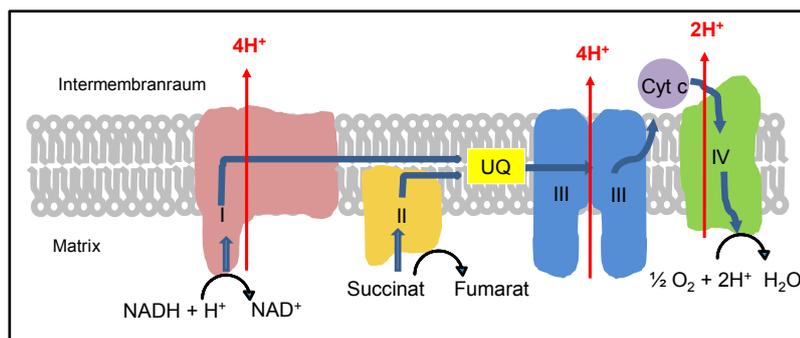
**Abb. 2** Vergleichende schematische Darstellung biologischer und biohybrider Redoxsysteme

Die Selektivität und Spezifität der Biokomponenten werden für analytische Zwecke nutzbar gemacht.<sup>[5]</sup> Diese Systeme sind mit ET-Schritten verbunden, welche direkt - von einem System zu einem anderen - oder über redoxaktive Hilfssubstanzen (Mediatoren) vermittelt ablaufen können. Diese Mediatoren können in Form von frei beweglichen oder immobilisierten Molekülen gebildet werden. Eine Möglichkeit der Immobilisierung ist z.B. die Ankopplung in polymeren Materialien.<sup>[6]</sup> Für den Aufbau dieser biohybriden Redoxsysteme

werden die wichtigsten Mechanismen für effektive ET-Prozesse von den nativen Systemen abgeschaut. Die ET-Ketten in nativen Systemen wie z.B. der Atmungskette (Abb. 3) sind sehr komplex aufgebaut und zeigen folgende Kerneigenschaften:

- Der ET erfolgt unidirektional über membrangebundene (Komplexe I bis IV) und diffundierende Komponenten (Cyt c: Cytochrom c und UQ: Ubichinon ).
- Der exergonische Elektronenfluss erfolgt energetisch „bergab“ entlang eines stufenweisen Redoxgradienten von  $-0.32\text{ V}$  ( $\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2\text{ e}^- \rightarrow \text{NADH}$ ) zu  $+0.82\text{ V}$  ( $\frac{1}{2}\text{ O}_2 + 2\text{ H}^+ + 2\text{ e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ ).
- Die ET-Reaktionen verlaufen in kleinen Teilschritten ab und sind räumlich voneinander getrennt.
- Die Elektronenübertragenden Gruppen liegen nach dem ET unverändert vor.

Diese Mechanismen verhindern einen Abbruch oder die Rückreaktion des ET und der Elektronenfluss in eine bestimmte Richtung, zu einer definierten Zielsubstanz, ist gewährleistet.



**Abb. 3** Schema der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran (modifiziert nach <sup>[7]</sup>); I: NADH-Dehydrogenase; II: Succinat-Dehydrogenase; III: Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase ; IV: Cytochrom c-Oxidase; Cyt c: Cytochrom c; UQ: Ubichinon

In der Biotechnologie werden biohybride Redoxsysteme z.B. in Biophotozellen, Biobrennstoffzellen oder Biosensoren eingesetzt. Es werden natürliche Moleküle oder Zellen mit künstlichen Substanzen zur Licht- oder Energiegewinnung kombiniert. Außerdem werden bekannte natürliche Prozesse, wie der Elektronentransfer von Enzymen zu Elektronenakzeptoren, ausgenutzt und modifiziert in Biosensoren integriert. Im Folgenden werden die Redoxsysteme der Biophotozelle, Biobrennstoffzelle und Biosensoren vorgestellt.

### 1.2.1.1 **Biophotozellen**

Die Umwandlung von photonischer in chemische Energie treibt fast alle Ökosysteme der Erde an.<sup>[2]</sup> Die Umwandlungsorganellen, die Chloroplasten, weisen einen modularen Aufbau auf. Damit werden die durch lichtinduzierten Ladungstransfer erzeugten Elektronen schnell zu einer Reihe weiterer Funktionskomplexe transportiert. Die Energieeffizienz eines Chloroplasten beträgt ca. 8-9 % unter optimalen Bedingungen.<sup>[2]</sup> Die Umwandlung von photonischer Energie in chemische oder physikalische soll zur Bereitstellung erneuerbarer Energien eingesetzt werden.

Eine richtungweisende Biophotozelle von Gust *et al.* enthält eine Triade (Carotin-Porphyrin-Chinon = Car-Por-Ch), die in aus Lipiddoppelschichten aufgebauten Vesikeln inkorporiert wird. Diese Triade richtet sich in der Membran mit der lipophilen Carotinoid-Einheit zur Membraninnenseite und mit der hydrophilen Chinon-Einheit zur wässrigen Umgebung aus. Ein hydrophobes Chinon dient als frei beweglicher Elektronenakzeptor. Über einen lichtinduzierte, ladungsseparierten Zustand kommt es zu einer Protonentranslokation, welche in Verbindung mit einer membrangebundenen ATP-Synthase zum Aufbau von ATP genutzt wird. Somit wird Licht in chemische Energie umgewandelt.<sup>[8]</sup>

Eine weitere Biophotozelle mit modularem Aufbau wird durch Selbstassemblierung von Fulleren-modifizierten Bakteriochlorin-Zinkchlorin-Aggregaten als biomimetische Lichtsammelkomplexe mit einer Lichtumwandlungseinheit aufgebaut. Der Energietransfer/Ladungsumwandlungsweg erfolgt von den Zinkchlorin-Aggregaten auf die Bakteriochlorin-Fulleren-Aggregate. Eine Energieeffizienz (Energie in Ladung) von 90 % wird erreicht.<sup>[9]</sup>

### 1.2.1.2 **Biobrennstoffzellen**

Biobrennstoffzellen dienen der Umwandlung von chemischer Energie in physikalische. Diese Umwandlung soll z.B. zum Antrieb medizinischer, implantierbarer Geräte (Herzschrittmacher, *in-vivo*-Biosensoren) Verwendung finden.<sup>[10]</sup> Mikrobielle und enzymatische Brennstoffzellen bilden die zwei Klassen der Biobrennstoffzellen, wobei die energieumwandelnden Einheiten durch Enzyme innerhalb<sup>[11-13]</sup> bzw. außerhalb<sup>[14-17]</sup> von Organismen dargestellt werden. Durch Freisetzung von Elektronen während des Substratumsatzes und dem Kontakt zu Elektroden wird die Energie umgewandelt. Biobrennstoffzellen sind energieumwandelnde Einheiten, die einen hohen Anspruch an Stromerzeugung und Stabilität erfüllen müssen. Mikrobielle Brennstoffzellen zeigen aufgrund der Widerstände gegen den Massentransfer über die Zellmembran geringere Stromdichten als die enzymatischen. Enzymatische Brennstoffzellen produzieren höhere Stromdichten, zeigen aber eine eingeschränkte Stabilität aufgrund der limitierten Lebenszeit extrazellulärer Enzyme.<sup>[17]</sup>

Die Einsatzmöglichkeiten für Biobrennstoffzellen lassen sich je nach eingesetztem Brennstoff in drei Klassen zusammenfassen: 1) Brennstoffe aus Tieren oder Menschen - implantierbare Zellen; 2) Brennstoffe aus Pflanzensaft - für Abwasser oder andere Abfälle oder 3) Brennstoff aus herkömmlichen Brennstoffen wie Wasserstoff, Methanol oder anderen Alkoholen.<sup>[18]</sup>

Ein Beispiel für eine enzymatische Glucose-O<sub>2</sub>-Biobrennstoffzelle besteht aus einer Glucoseoxidase-basierten Anode und einer Bilirubinoxidase-basierten Kathode. Unter Verwendung von Redoxpolymer-modifizierten Kohlenstoff-Fasern (Osmiumbiimidazol-Poly(vinylpyridin) bzw. Osmiumbipyridin-Poly(vinylimidazol)) produziert die Zelle bei einem Arbeitspotential von + 520 mV (Ag|AgCl) in einem Glucoseangereicherten Puffer kontinuierlich 4.4 µW bei 37°C, wird sie in eine Weintraube implantiert produziert sie 2.4 µW bei 25°C.<sup>[19]</sup>

Eine membran-, mediator- und cofaktorlose Glucose-O<sub>2</sub>-Biobrennstoffzelle produziert bei + 500 mV (NHE) 5 µW cm<sup>-2</sup> mit einer Lebensdauer von > 38 h. Der direkte ET immobilisierter Cellobiosedehydrogenase (aus *Dichomera saubinetii*) und Laccase (aus *Trametes hirsuta*) wird beim Aufbau der anodischen und kathodischen Bioelemente ausgenutzt.<sup>[10]</sup>

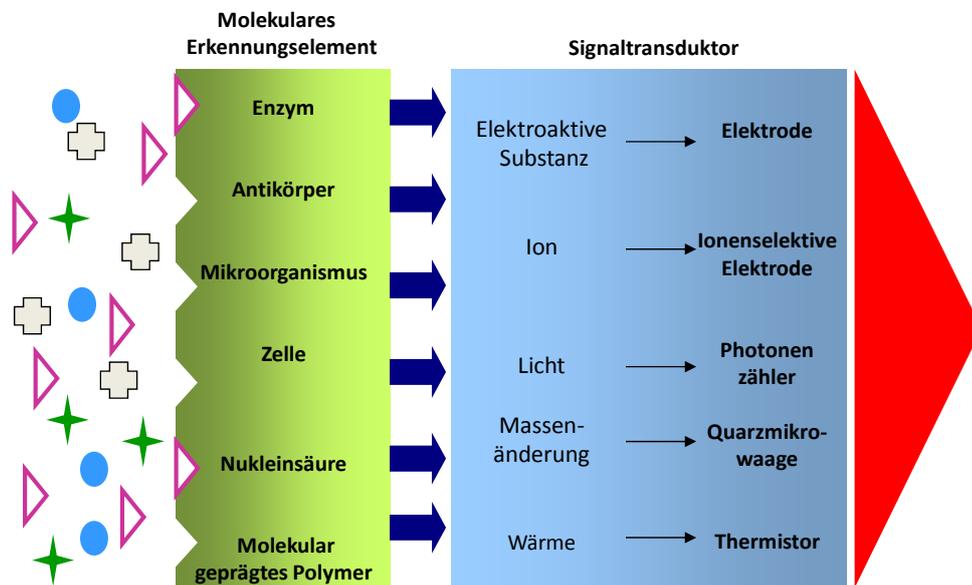
### 1.2.1.3 Biosensoren

Wird der natürliche Elektronenakzeptor in einer Enzymkatalyse durch eine Elektrode ersetzt, werden biohybride Enzymsensoren erhalten. Der Substratumsatz kann in Form eines Stromflusses detektiert und so zur Quantifizierung der Substanzkonzentration herangezogen werden. Im Gegensatz zu den Biophoto- und Biobrennstoffzellen verbrauchen sie Energie.

Laut IUPAC-Definition (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) sind Biosensoren chemische Sensoren mit biochemischen Erkennungselementen. Sie überführen biochemische Informationen in analytisch nutzbare Signale. Diese Signale können Informationen über Konzentrationen spezieller Proben bis hin zu deren Zusammensetzungen liefern. Die beiden Hauptelemente eines Biosensors sind die Erkennungsmoleküle und der Transduktor, beide sind direkt räumlich eng miteinander gekoppelt.<sup>[5]</sup>

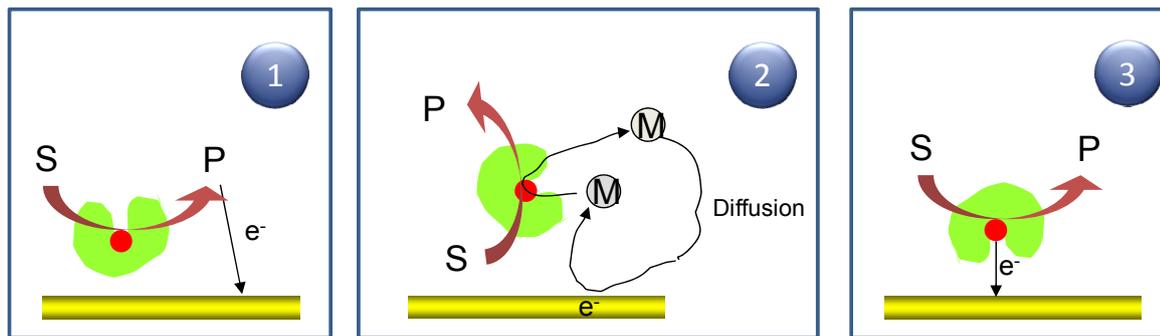
Als Bioerkennungsmoleküle dienen Antikörper, Enzyme, Nukleinsäuren, Zellen oder andere Moleküle (Abb. 4). Durch die Verwendung von spezifischen Erkennungselementen, wird die Selektivität der Sensoren bestimmt. Sie können, je nach Wahl des Erkennungsmoleküls, klassenspezifisch oder analytspezifisch sein. Der Transduktor, auch Detektor, Sensor oder Elektrode genannt, überführt das Signal von der Ausgabestelle des Erkennungsmoleküls in ein Signal. Die Transduktoren können elektrochemischer, optischer, kalorimetrischer oder piezoelektrischer Art sein. Der Vorteil der elektrochemischen, kalorimetrischen und piezoelektrischen Transduktoren gegenüber den optischen besteht darin, dass gefärbte oder trübe Lösungen die Detektion nicht beeinflussen. Die Ausführungen sollen auf die

elektrochemischen Enzymsensoren beschränkt werden, da sie für diese Arbeit von Interesse sind.



**Abb. 4** Schematische Darstellung von Biosensoren

Wird ein Enzym als Erkennungsmolekül an einer Elektrode verwendet, handelt es sich um einen elektrochemischen Enzymsensor. Es werden drei Generationen der amperometrischen enzymgekoppelten Biosensoren (Abb. 5) unterschieden. In der **ersten Generation** wird die Produktbildung (z.B.  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei  $E = +600 \text{ mV}$ ) oder der Substratverbrauch (z.B.  $\text{O}_2$  bei  $E = -600 \text{ mV}$ ) zur Detektion verwendet. Produkt bzw. Substrat lassen sich durch direkte Oxidation oder Reduktion an der Elektrode quantifizieren.<sup>[20]</sup> Die **zweite Generation** beschäftigt sich mit dem mediatorvermittelten Elektronentransfer. Der Mediator kann frei diffundieren,<sup>[21-23]</sup> am Enzym angekoppelt<sup>[24, 25]</sup> oder auf der Elektrode immobilisiert sein,<sup>[26-28]</sup> um die Elektronen vom Enzym zur Elektrode zu transportieren. In der **dritten Generation** der Biosensoren wird die direkte Oxidation/Reduktion des Coenzym verwendet. Dazu muss das Enzym ein direkt zugängliches aktives Zentrum und die richtige Orientierung zur Elektrode aufweisen oder es müssen neue Elektrodenmaterialien verfügbar sein.<sup>[6, 29, 30]</sup>



**Abb. 5** Schematische Darstellung der Biosensor-Generationen. 1) Oxidation oder Reduktion von Substrat oder Produkt an der Elektrode; 2) mediatorvermittelter Elektronentransfer; 3) direkter Elektronentransfer

Diese Sensoren lassen sich zur direkten Quantifizierung des Enzymsubstrates oder zur Detektion eines Analyten über ein enzymmarkiertes Konjugat (Immunosensor) einsetzen.<sup>[20, 31-33]</sup> Ein Beispiel für einen elektrochemischen Immunosensor ist der elektrochemische Nachweis von glykiertem Hämoglobin (HbA1c). Das Bindungsprotein Haptoglobin (Hp) wird auf einer Dialysemembran vor einer Platinelektrode immobilisiert. Die Bindung des HbA1c im Konzentrationsbereich von 0 bis 25 % an das Hp kann mit einem Glucoseoxidase-markierten Antikörper über die Produktion von Wasserstoffperoxid und dessen amperometrischer Umsetzung bei + 600 mV (Ag|AgCl) quantifiziert werden.<sup>[34]</sup>

## 1.2.2 Redoxreaktionen

### 1.2.2.1 Elektronentransfer (ET)

Biohybride Redoxsysteme basieren auf Redoxreaktionen. Diese Reaktionen gehen mit einem Elektronentransfer einher und können an einen Protonentransfer gekoppelt sein: Bei einer Oxidation werden Elektronen abgegeben und bei einer Reduktion aufgenommen. Da bei einer chemischen Reaktion keine freien Elektronen vorkommen können, treten diese Reaktionen immer gemeinsam auf. Dabei werden die Elektronen vom Donor zum Akzeptor übertragen. Die Tendenz Elektronen abzugeben und aufzunehmen, ist unterschiedlich stark ausgeprägt. Je stärker diese Tendenz ist, umso zunehmender ist die reduzierende Wirkung dieses Stoffes, und umgekehrt. Das Oxidations- bzw. Reduktionsvermögen eines Redoxsystems wird durch sein Redoxpotential  $E$  ausgedrückt. Dieses lässt sich durch die Nernstsche Gleichung (1) beschreiben, wobei  $E^0$  das Standardpotential,  $R$  die Gaskonstante,  $T$  die Temperatur,  $z$  die Zahl der übertragenen Elektronen und  $F$  die Faraday-Konstante bedeuten.

$$E = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_{ox}}{c_{red}} \quad (1)$$

$E^0$  ist eine für jedes Redoxsystem spezifische Kenngröße und wird gegen eine Bezugsgröße, die Standardwasserstoffelektrode, bestimmt. Der zweite Term dagegen ist konzentrations- und temperaturabhängig.

Die Standardpotentiale sind ein Maß für das Redoxverhalten von Redoxsystemen. Die Substanzen werden nach der Größe ihrer Standardpotentiale geordnet und somit eine Redoxreihe, die so genannte elektrochemische Spannungsreihe, erhalten. Ein Elektronentransfer kann nur von einer reduzierten Form zu einer oxidierten Form höheren Potentials, bei entsprechenden Konzentrationsverhältnissen, stattfinden („down hill“).

Eine wichtige Beschreibung für ET-Reaktionen wurde von Marcus dargelegt (Marcus-Theorie).<sup>[35]</sup> Sie bildet die Grundlage für die Kinetik von ET-Reaktionen. Nach ihr lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten  $k$  laut Gleichungen 2-4 berechnen.

$$k = A \cdot e^{\left(\frac{-\Delta G^*}{k_B T}\right)} \quad (2)$$

$$\text{mit } \Delta G^* = \frac{\lambda}{4} \left(1 + \frac{\Delta G^0}{\lambda}\right)^2 \quad (3)$$

$$\text{und } \lambda = \lambda_0 + \lambda_i \quad (4)$$

Dabei ist  $\Delta G^*$  die Gibbs-Aktivierungsenergie-Differenz,  $k_B$  die Boltzmann-Konstante und  $T$  die Temperatur.  $\Delta G^0$  ist die Gibbs-Standardenergie-Differenz und der Term  $A$  ist abhängig von der ET-Reaktion, z.B. ob sie inter- oder intramolekular verläuft.  $\Delta G^*$  berechnet sich laut Gleichung 3, der Reorganisationsterm  $\lambda$  setzt sich aus einem lösungsmittelabhängigen  $\lambda_0$  und einem Schwingungsterm  $\lambda_i$  zusammen. Der Abstand der beiden Reaktanten voneinander fließt im Term  $\lambda_0$  (Gleichung 5) in die Gleichung ein.

$$\lambda_0 = (\Delta e)^2 \left( \frac{1}{2a_1} + \frac{1}{2a_2} - \frac{1}{R} \right) \left( \frac{1}{D_{op}} - \frac{1}{D_s} \right) \quad (5)$$

Hierbei steht im Zwei-Ionen-Modell  $\Delta e$  für die ausgetauschte Ladung,  $a_1$  und  $a_2$  für die Ionenradien,  $R$  für den Zentrumsabstand der beiden Reaktanten und  $D_{op}$  und  $D_s$  für die optische und statische Dielektrizitätskonstante.

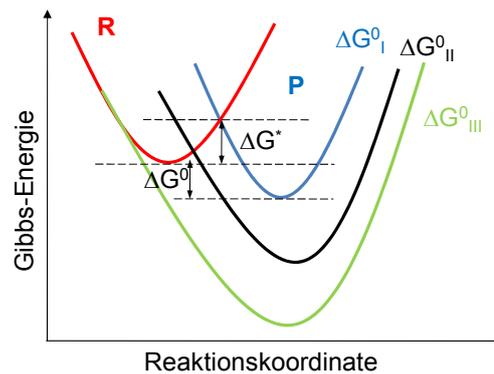
Die elektrochemische Geschwindigkeitskonstante, für den ET von einem redoxaktiven Teilchen zur Elektrode, lässt sich ebenfalls durch die Marcus-Theorie ausdrücken (Gleichung

6-7).<sup>[35]</sup> In dem Fall wird  $\Delta G^0$  durch die Größen  $e\eta$  ersetzt, wobei  $e$  die übertragene Ladung bezeichnet und  $\eta$  die Überspannung. Der Term  $1/2a_2$  in Gleichung (5) entfällt, da es sich um einen ET von einem Ion zur Elektrode handelt und es somit nur ein Ion als Reaktanten gibt.  $R$  ist nun der zweifache Abstand des geladenen Teilchens von der Elektrodenoberfläche.

$$\Delta G^* = \frac{\lambda}{4} \left( 1 + \frac{e\eta}{\lambda} \right)^2 \quad (6)$$

$$\text{und } \lambda_0 = (\Delta e)^2 \left( \frac{1}{2a_1} - \frac{1}{R} \right) \left( \frac{1}{D_{op}} - \frac{1}{D_s} \right) \quad (7)$$

Die ET-Reaktion lässt sich durch parabolische Gibbs-Energie-Kurven in einfacher und anschaulicher Weise darstellen. Eine Veränderung der  $\Delta G^0$  der Produkte (P) zu positiveren Werten führt zur Erhöhung der  $\Delta G^*$  und zu kleineren Geschwindigkeitskonstanten (Abb. 6).



**Abb. 6** Auftragung der Gibbs-Energie gegen die Reaktionskoordinate für Reaktanten (R) und Produkte (P) einer Elektronentransfer-Reaktion für unterschiedliche Gibbs-Standardenergien  $\Delta G^0$  (I, II und III),  $\Delta G^*$  Aktivierungsenergie (modifiziert nach <sup>[35]</sup>)

Diese ET-Theorie lässt sich, wie schon angedeutet, sowohl auf native, biomimetische als auch auf elektrochemische Prozesse anwenden.

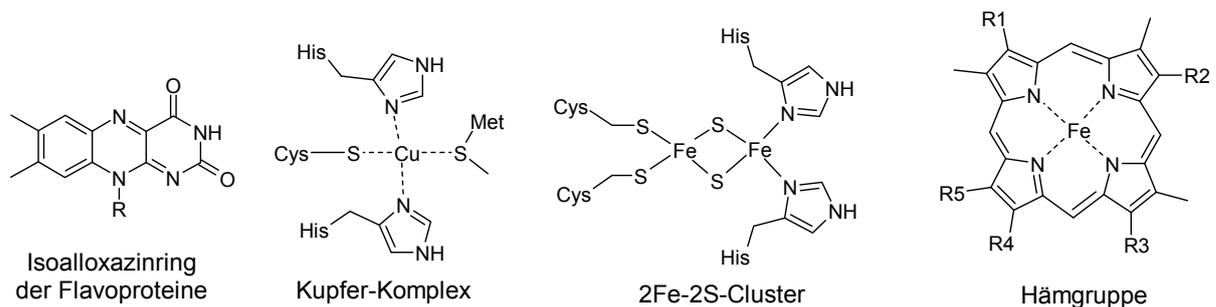
### 1.2.2.2 Oxidoreduktasen

Die Oxidoreduktasen bilden die erste Klasse der Enzyme. Die Enzyme werden nach der IUBMB (*Internationalen Vereinigung der Biochemie und Molekularbiologie*) folgendermaßen klassifiziert:

1. Oxidoreduktasen,
2. Transferasen,
3. Hydrolasen,
4. Isomerasen und
5. Ligasen.

Zur Klasse der Oxidoreduktasen zählen Dehydrogenasen, Oxidasen, Reduktasen, Oxygenasen und Peroxidasen. Die Oxidoreduktasen katalysieren die Übertragung von Redoxäquivalenten zwischen zwei Redoxsystemen.

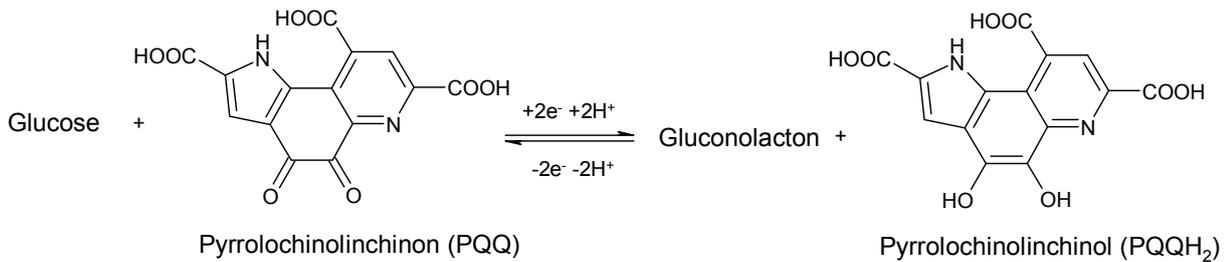
An den Elektronenübertragungen nehmen u.a. Sauerstoff, Eisen-Schwefel-Proteine, Flavoproteine oder Hämgruppen teil (Abb. 7). Im Folgenden werden die zwei, für diese Arbeit wichtigen Oxidoreduktasen genauer betrachtet.



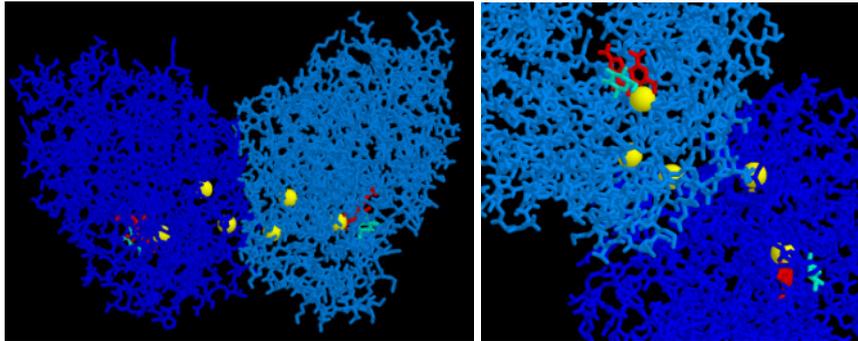
**Abb. 7** Strukturbeispiele Elektronenübertragender Gruppen in nativen Systemen

#### ***Pyrrolochinolinchinon-abhängige Glucosedehydrogenase (PQQ-GDH)***

Die PQQ-GDH (1.1.5.2 *früher: 1.1.99.17*) ist eine sauerstoffunabhängige Glucosedehydrogenase. Das Coenzym Pyrrolochinolinchinon (PQQ) ist ein *ortho*-Chinon und koordinativ in die aktiven Zentren über je ein Calciumion eingebaut. Die Elektronendonatoren und -akzeptoren müssen zum aktiven Zentrum diffundieren. Der Elektronentransfer des Enzyms ist an den Transfer von Protonen gekoppelt (Abb. 8). Die PQQ-GDH setzt verschiedene Mono- und Disaccharide um und ist nicht spezifisch für  $\beta$ -Glucose. Ihre natürlichen Elektronenakzeptoren sind Cytochrom *b562* oder Ubichinon 9. Sie wird als Apo-GDH hergestellt, die Rekonstituierung mit PQQ erfolgt im Anschluss *in vivo* oder *in vitro* in Anwesenheit von Calciumionen.<sup>[36, 37]</sup>



**Abb. 8** Redoxreaktion der PQQ-GDH



**Abb. 9** Strukturmodell der PQQ-GDH (sGDH) (*Acinetobacter calcoaceticus* 1cq1.pdb); dunkelblau: Untereinheit 1 und hellblau: Untereinheit 2; gelb: Calciumionen; rot: PQQ; cyan: Glucose

Die PQQ-GDH wurde in verschiedenen Bakterienspezies (u.a. *E. coli*, *Pseudomonas* sp., *Erwinia* sp.) entdeckt. In den meisten Bakterien liegt die PQQ-GDH als membran-gebundenes Enzym vor. *Acinetobacter calcoaceticus* verfügt über zwei funktionell und strukturell verschiedene PQQ-GDH, die membrangebundene (mGDH) und die lösliche (sGDH).

Die sGDH ist ein lösliches, dimeres Enzym aus dem Periplasma. Pro Untereinheit (UE) werden drei Calciumionen für ein funktionelles Enzym benötigt, eins für die Integration des PQQ und zwei für die Dimerisierung. Die zwei identischen UE von ca. 50.000 Dalton werden somit über insgesamt vier Calciumionen verbunden (Abb. 9).

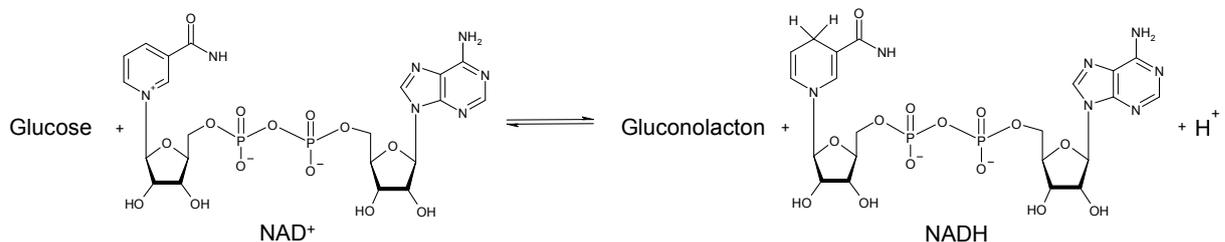
Die mGDH ist ein hydrophobes Protein und besteht aus einer UE von ca. 83.000 Dalton mit einem PQQ-Molekül als Coenzym. Ihre Substrate sind verschiedene Monosaccharide.<sup>[38]</sup>

PQQ-abhängige Enzyme wie die Glucose- oder Alkoholdehydrogenase finden Anwendung in der Biosensorik, in dieser Arbeit wird die sGDH eingesetzt.<sup>[39, 40]</sup>

### **Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-abhängige Glucosedehydrogenase (NAD-GDH)**

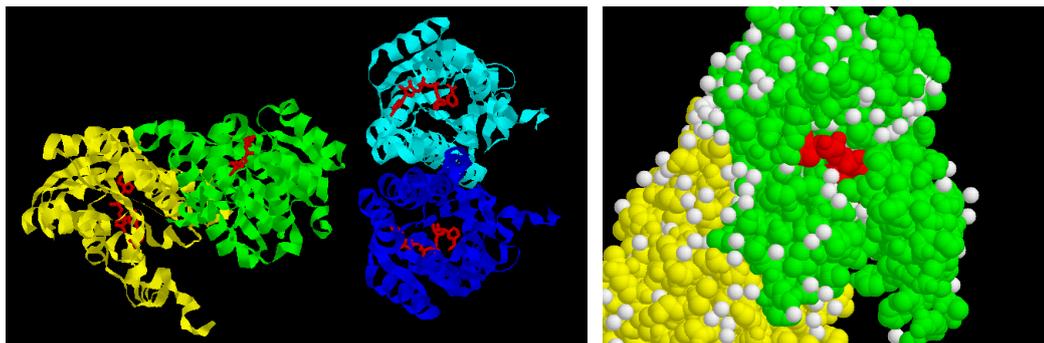
NAD-abhängige Dehydrogenasen bilden eine große Gruppe der Redoxenzyme. Die Anzahl der Substrate ist vielfältig. Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid (NAD) ist ein Coenzym für

mehr als 400 verschiedene Oxidoreduktasen, 250 verwenden  $\text{NAD}^+$  und 150 die phosphorylierte Form  $\text{NADP}^+$ .<sup>[41]</sup> Das entspricht einer Menge von ca. 17 % aller klassifizierten Enzyme. Ist die elektrochemische Kontaktierung eines NAD-abhängigen Enzyms erfolgreich, kann das System möglicherweise auf die anderen NAD-Enzyme übertragen werden. Damit stünde ein breites Analytenspektrum zur Verfügung. In dieser Arbeit wird die NAD-GDH als Beispiel für die NAD-Enzyme verwendet. Im Unterschied zu den PQQ-abhängigen Enzymen ist das verwendete NAD ein frei bewegliches Coenzym. Es diffundiert zwischen Elektronenakzeptor bzw. -donor und Enzym hin und her und wird reversibel zu NADH umgesetzt. Es findet formal ein Hydridtransfer ( $\text{H}^+ + 2 \text{e}^-$ ) statt (Abb. 10).



**Abb. 10** Redoxreaktion der Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-Glucosedehydrogenase

Die NAD-GDH (1.1.1.47) aus *Bacillus megaterium* ist ein Enzym des Pentose-Phosphatweges und gehört der Familie der Kurzketten-Dehydrogenasen an. Sie besteht aus 4 identischen UE von ca. 30.000 Dalton (Abb. 11). Das Enzym setzt spezifisch  $\beta$ -Glucose und  $\beta$ -2-Deoxy-Glucose um, wobei  $\beta$ -Glucose favorisiert wird.<sup>[42, 43]</sup>



**Abb. 11** Strukturmodell der NAD-GDH (*Bacillus* sp. 1gco.pdb) gelb: UE F, grün: UE E, blau: UE A, cyan: UE B, weiß: Wasser, rot: NADH (nach<sup>[43]</sup>)

Aufgrund des niedrigen Redoxpotentials von  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  (-320 mV vs. NHE) liegt das Reaktionsgleichgewicht auf der Seite des reduzierten Coenzym. Für eine effiziente Oxidation ist es zweckmäßig, das entstehende NADH zu entfernen um das Gleichgewicht in Richtung Glucoseoxidation zu verschieben. Die direkte elektrochemische Oxidation des

Coenzym NADH erfolgt bei relativ hohen Überspannungen von bis zu 1 V (NHE).<sup>[44]</sup> Oxidierte Zwischenprodukte können an der Elektrode adsorbieren und damit zum Elektroden-„Fouling“ führen. Daher ist ein zügiger Abtransport notwendig oder der Einsatz geeigneter Redoxmediatoren, wodurch der Elektrodenkontakt vermieden wird.<sup>[44]</sup> In Biosensoren oder enzymatischen Tests gelingt dies durch eine nachgestellte Enzymreaktion, z.B. Diaphorase, oder eine schnelle elektrokatalytische Oxidation, die durch einen Mediator vermittelt wird.<sup>[44]</sup>

Die in dieser Arbeit verwendete NAD-GDH stammt aus *Pseudomonas sp.* und gleicht laut Angaben des Lieferanten weitestgehend dem Enzym aus *Bacillus sp.*

### 1.2.3 Redoxpolymere

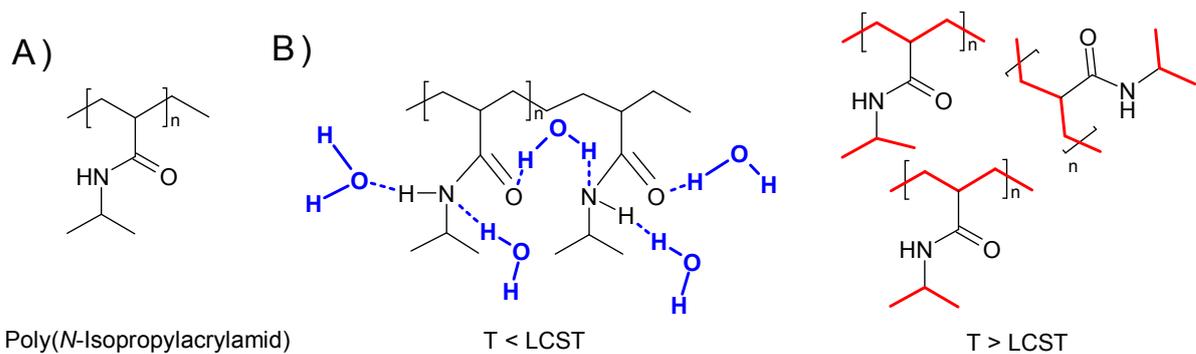
#### 1.2.3.1 Hydrophile Polymere / Hydrogele

Hydrogele sind dreidimensionale, strukturierte Netzwerke aus hydrophilen Polymeren. Sie haben eine hohe Affinität zu Wasser ohne sich darin zu lösen. Ihr Wassergehalt kann mehr als 50 % ihrer Gesamtmasse betragen.<sup>[45, 46]</sup> Abhängig von Zusammensetzung, Vernetzungsgrad und Hydrophobizität weisen sie unterschiedliche Eigenschaften auf. Die Polymerketten dieser „smarten“ (engl. *clever, schlau, intelligent*) Materialien können durch äußere Reize (z.B. Änderung von pH, Temperatur oder Salzkonzentration) einer Konformationsänderung unterliegen.

Aufgrund ihrer guten Quell- und Schrumpfeigenschaften finden diese „intelligenten“ Materialien Einsatz im „drug delivery“ (Medikamentenfreisetzung) als auch im „Tissue Engineering“ (künstliche Gewebeherstellung). Hydrogele können natürlicher oder synthetischer Herkunft sein. Biologische Hydrogele werden z.B. von Gelatine, Kollagen, Fibrin, Dextran, Alginat oder Chitosan gebildet. Sie weisen eine geringe Toxizität und eine hohe Biokompatibilität auf. Nachteilig sind die mechanische Instabilität und der natürliche Abbau.<sup>[46]</sup> Synthetische Hydrogele sind z.B. Poly(ethylenglykol) (PEG), Poly(acrylsäure), Poly(vinylalkohol) oder Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM). Sie können in gewünschter Länge, Zusammensetzung, mechanischer Festigkeit, biologischer oder chemischer Eigenschaft und Widerstand gegen Biodegeneration synthetisiert werden.<sup>[45, 47]</sup> Auch Poly(vinylpyridin) und Poly(vinylimidazol) werden als Hydrogele bezeichnet. Sie bilden aufgrund ihrer quarternisierten Stickstoffatome in den Seitenketten Polykationen. Sie sind in der Lage Metallionen wie Os und Ru zu komplexieren und damit im Hydrogel zu immobilisieren.<sup>[17, 48]</sup> Die Polymerseitenketten sind allerdings aufgrund der Ringsysteme relativ starr. Es soll im Weiteren auf PNIPAM und PEG eingegangen werden, da sie in dieser Arbeit Anwendung fanden.

**Poly(*N*-Isopropylacrylamid) (PNIPAM)**

PNIPAM ist ein gut charakterisiertes, u.a. Temperatur-schaltbares Polymer (Abb. 12 A). Für thermoresponsive Polymere kann eine untere kritische Entmischungstemperatur (lower critical solution temperature, LCST) bestimmt werden. Bei dieser Temperatur findet ein Volumen-Phasenübergang statt. Für PNIPAM liegt die LCST bei  $\sim 32\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Bei Temperaturen unterhalb der LCST findet eine Interaktion der Amidgruppen mit Wassermolekülen statt; das Polymer ist gequollen. Bei Temperaturen oberhalb der LCST werden die Wasserstoffbrücken aufgebrochen, das Wasser aus dem Polymer gedrängt und die hydrophoben Domänen aggregieren; folglich schrumpft das Polymer (Abb. 12 B). Die LCST des Polymers kann durch Einführen hydrophiler (z.B. Acrylamid)<sup>[49]</sup> oder hydrophober (z.B. Styren)<sup>[50]</sup> Monomere oder durch Zugabe unterschiedlicher Salze (Hofmeister Serie)<sup>[51, 52]</sup> oder Tenside<sup>[53]</sup> zu gewünschten LCST verschoben werden.<sup>[47]</sup> Damit lassen sich „maßgeschneiderte“ Temperatur-abhängige Polymere erschaffen.



**Abb. 12** Schema des Poly(*N*-Isopropylacrylamides) (A) und sein Verhalten unter- und oberhalb der LCST (B), blau: H<sub>2</sub>O, rot: hydrophobe Bereiche (modifiziert nach<sup>[52]</sup>)

Anwendungsgebiete für PNIPAM-Polymere und Copolymere sind vielfältig. Es wird in der Herstellung kontrollierbar permeabler Filme<sup>[54-58]</sup> und thermischer Schalter,<sup>[59-61]</sup> der „drug delivery“,<sup>[62-64]</sup> Enzym-Mimiks<sup>[65-67]</sup> oder als Immobilisierungsmatrices für die Biosensorik<sup>[68-71]</sup> verwendet. In der Zellkultur findet PNIPAM Anwendung zur schonenden Ablösung adhärenter Zellen.<sup>[72-75]</sup> PNIPAM-co-PEG-modifizierte Goldchips bilden biokompatible, schaltbare Oberflächen. Die Zellen wachsen auf dem bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschrumpften Polymer, bei Raumtemperatur werden die Zellen schonend durch das Quellen des Polymers von der Oberfläche abgelöst. Ein PNIPAM-Mikroventil dient der Öffnung und Schließung von Durchflusskanälen für die Anwendung in der Mikrofluidik.<sup>[76, 77]</sup> Tatsuma *et al.* setzten PNIPAM als Immobilisierungsmatrix für GOD ein. Zusätzlich dient das integrierte Ferrocenredoxzentrum dem mediatorvermittelten ET.<sup>[70]</sup> PNIPAM ist ein hydrophiles Polymer

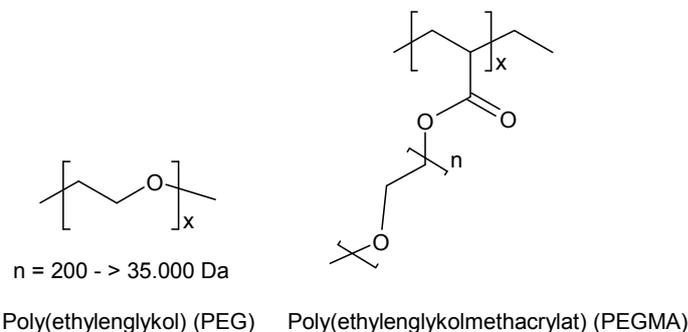
mit einer Temperatur-schaltbaren Änderung des Quellverhaltens, die in dieser Arbeit für den Aufbau schaltbarer Redoxpolymere eingesetzt werden soll.

### **Poly(ethylenglykol) (PEG)**

PEG sind lineare, langkettige Glykolether (Abb. 13 links). Ihre chemische Reaktivität wird durch die endständige Hydroxylgruppe bestimmt, die verestert, verethert oder mit Isocyanaten zu Urethanen umgesetzt werden können. Je nach Molekulargewicht handelt es sich um flüssige (200 – 400 Da), pastöse (600 – 3500 Da) oder feste (> 3000 Da) Substanzen. Härte und Schmelzbereich steigen mit zunehmendem Molekulargewicht. Polymere mit einem Molekulargewicht bis 35.000 Da werden als PEG, darüber hinaus werden sie als Poly(ethylenoxid) (PEO) bezeichnet. Die endständige Hydroxylgruppe verliert hier ihren Einfluss. Flüssige PEG sind in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar. Sie lösen sich weiterhin gut in vielen organischen Lösungsmitteln.

PEG ist nicht-toxisch, nicht-immunogen und biokompatibel. Es findet weit verbreitete Anwendung in Nahrungsmitteln, pharmazeutischen Produkten (z.B. Wirkstoffträger in Salben, Tropfen) und Kosmetika (u.a. Cremes, Lippenstift). Wegen seiner Wasserbindungskapazität wird es auch zur Trocknung von Holz und zur Präparation biologischer und medizinischer Präparate verwendet. PEG-modifizierte Oberflächen wirken Protein- und Zellabweisend, aufgrund der sterischen Abstoßung zwischen hydratisiertem, neutralen PEG und Proteinen.<sup>[45, 78]</sup>

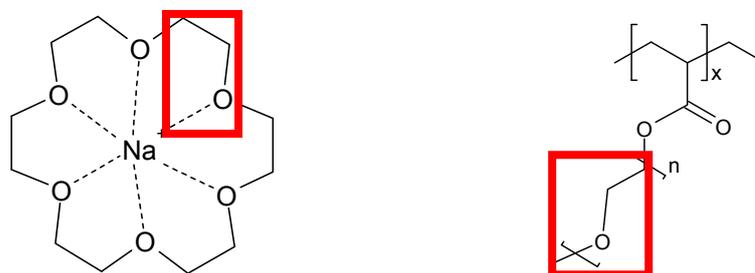
Neben dem linearen PEG gibt es nicht-lineare PEG-Methacrylate (PEGMA) (Abb. 13 rechts), Methacrylate mit PEG-Seitenketten. Diese können zur einfachen freien, radikalischen Polymerisation verwendet werden. Bei langen PEG-Seitenketten weisen die Polymere PEG-ähnliche Eigenschaften auf, werden kurz-kettige PEGMA verwendet, gewinnt die hydrophobe Methacrylatgruppe an Einfluss.



**Abb. 13** Schema von Poly(ethylenglykol) und Poly(ethylenglykolmethacrylat)

Diese PEGMA-Polymere weisen eine LCST abhängig von der Anzahl der PEG-Einheiten auf.<sup>[79-82]</sup> Durch die Wahl der Monomere und der entsprechenden Anteile lässt sich die LCST auf ein Grad genau einstellen. Die Kontrolle der genauen Polymerzusammensetzung wird durch die Atomtransferradikalpolymerisation (ATRP) erreicht.<sup>[79]</sup> Aufgrund dieser Eigenschaften könnten die PEGMA-Polymere das PNIPAM als thermoresponsives Polymer ablösen. Immobilisierte Copolymere aus Oligo(ethylenglykolphosphat) und 2-(2-Methoxyethoxy)ethylmethacrylat finden Einsatz in der Zellkultur zur schonenden Ablösung adhärenter Zellen von Oberflächen.<sup>[78]</sup> Die Zellenabweisende Eigenschaft von PEG unterstützt diese Anwendung. Ähnlich wie schon bei den PNIPAM-modifizierten Goldchips, wachsen die adhären Zellen bei 37°C auf dem immobilisierten Polymerrasen an und lösen sich bei Überführung in Raumtemperatur von der Oberfläche schonend ab.

Es ist weiterhin bekannt, dass PEG-Ketten durch Komplexierung von Alkali- und Erdalkalitionen Kronenether-ähnliche Strukturen ausbilden können.<sup>[83-85]</sup> Poly(ethylenglykol)ketten weisen ähnlich zu Kronenethern wiederholende [-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-]Einheiten auf (Abb. 14). Die Ausbildung dieser supramolekularen Strukturen aus PEG-Ketten und Alkali-/Erdalkalitionen wurde mittels Ultrafiltration, <sup>13</sup>C-NMR, Leitfähigkeitsmessungen und Ionenselektiven Elektroden bestätigt.<sup>[83-85]</sup> Damit ist eine Strukturkontrolle über Ionenkonzentrationen möglich.



**Abb. 14** Vergleich der Strukturen von 18-Krone-6 (links) und Poly(ethylenglykolmethacrylat) (rechts). Die Polyethereinheiten sind rot markiert.

Diese supramolekularen Komplexe werden auch Wirt-Gast-Komplexe genannt. Die Durchmesser der Gast-Moleküle (Ionen) entscheiden über die Passfähigkeit in den Wirthohlräumen (PEG) und deren Stabilität.<sup>[85-87]</sup> Dabei sind die PEG-Ketten flexibler als die Kronenether. PEO-Ketten binden die Alkaliionen mit Bindungskonstanten entsprechend folgender Sequenz:  $\text{Li}^+ \ll \text{Na}^+ < \text{Rb}^+ \approx \text{K}^+ \approx \text{Cs}^+$ . Diese Reihenfolge gilt ebenso für die Komplexierung der Ionen durch Kronenether in Wasser und entspricht der Reihenfolge der zunehmenden Ionenradien.<sup>[85]</sup> Einige Ionenradien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

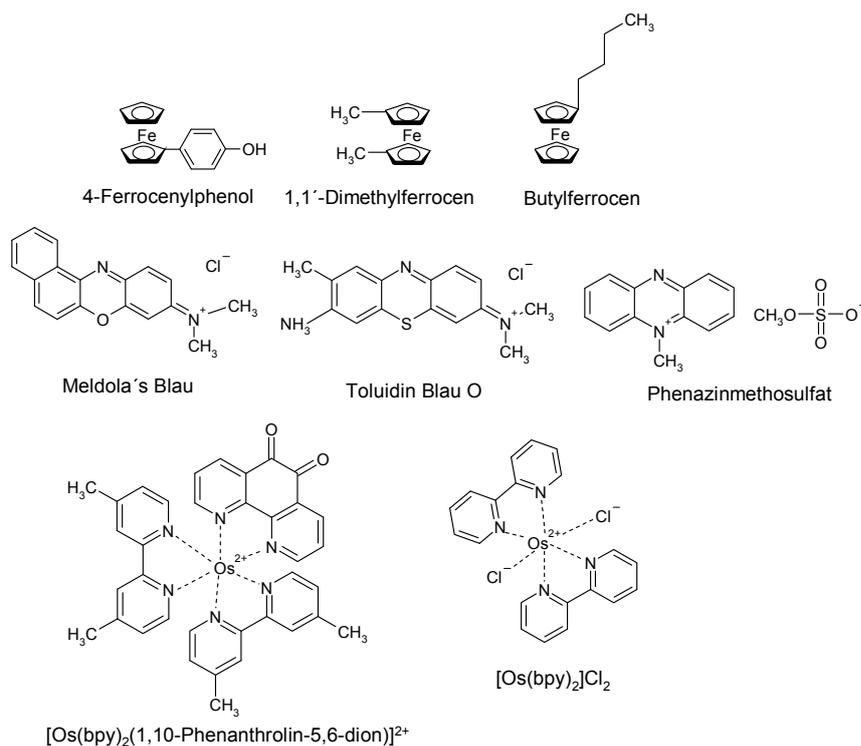
**Tabelle 1** Ionenradien ausgewählter Alkali- und Erdalkalitionen<sup>[88]</sup>

Ion	Ionenradius r/ pm
Li <sup>+</sup>	76
Na <sup>+</sup>	102
K <sup>+</sup>	138
Rb <sup>+</sup>	152
Cs <sup>+</sup>	167
Mg <sup>2+</sup>	72
Ca <sup>2+</sup>	100

Ein Calciumeffekt auf die Struktur wurde bereits bei Micellen aus einem Blockcopolymer aus PEG, Poly(acrylsäure) und Poly(*n*-Butylacrylat) (PEG-*b*-PAA-*b*-P*n*BA) beobachtet. Sie schrumpfen bei der Zugabe von Ca<sup>2+</sup>. Die nach außen gerichtete Corona aus Carboxylgruppen des PAA und die PEG-Sauerstoffatome binden die Ca<sup>2+</sup>-Ionen.<sup>[89]</sup>

### 1.2.3.2 Mediatoren

Häufig verwendete Mediatoren für Elektronenübertragungen in der Biosensorik sind *Ferrocenderivate* (z.B. Ferrocenphenol,<sup>[90-92]</sup> 1,1'-Dimethylferrocen,<sup>[23]</sup> Butylferrocen<sup>[93]</sup>), *Phenoxazine* (z.B. Meldola's Blau<sup>[94, 95]</sup>), *Phenothiazine* (z.B. Toluidin Blau O<sup>[96]</sup>) bzw. *Phenazine* (z.B. Phenazinmethosulfat<sup>[97]</sup>) oder *Metallkomplexe* (z.B. Osmiumbipyridylkomplexe [Os(bpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]<sup>[98-100]</sup>) (Abb. 15). Heller *et al.* verwenden Poly(vinylimidazol) bzw. Poly(vinylpyridin) komplexiert mit [Os(bpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]. Die Detektion erfolgt bei Redoxpotentialen von + 200 und + 400 (vs. SCE) bzw. + 450 mV (vs. Ag|AgCl) abhängig vom Messaufbau, Polymer und Analyten.<sup>[101, 102]</sup> Schuhmann *et al.* setzen ein [Os(bpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]-modifiziertes Pyrrolderivat zur Coelektropolymerisation mit unmodifiziertem Pyrrol ein bzw. wird der Os-Komplex in verschiedenen Polymethacrylaten verwendet. Die Redoxpotentiale der Os-Komplex-modifizierten Polymere liegen bei + 150 bzw. + 400 mV (Ag|AgCl).<sup>[103, 104]</sup>



**Abb. 15** Ausgewählte Strukturformeln häufig verwendeter organischer und Organometall-Mediatoren

Bei den Redoxreaktionen von NAD-GDH wird formal ein Hydridion und bei PQQ-GDH werden zwei Elektronen gekoppelt mit dem Transfer von zwei Protonen auf das Coenzym übertragen. Für einen effizienten ET vom Enzym zum Mediator sind daher, analog zur Natur, Zwei-Elektronen-2-Protonen-Übertragungen (2e-2H), sehr gut geeignet. Mögliche 2e-2H-übertragende Mediatoren sind z.B. *ortho*-Chinone. Ein Ein-Elektron-Überträger (1e), wie z.B. Ferrocen (Fc), kann ebenfalls verwendet werden. Hier muss der heterogene ET zwischen Elektrode und Mediator sehr schnell ablaufen, um zwei Elektronen schnell nacheinander vom Mediator auf das Enzym übertragen zu können. Für die Elektrokatalysen von NAD-GDH und PQQ-GDH wurden u.a. Mediatoren wie Fc,<sup>[92, 105]</sup> Phenothiazine/Phenazine,<sup>[106, 107]</sup> und Metallkomplexe<sup>[100, 104]</sup> beschrieben.

Nach der Verwendung von löslichen Mediatoren<sup>[21, 22]</sup> und der Immobilisierung in Kohlenstoffpaste-Elektroden<sup>[96, 108]</sup> oder kovalent auf Goldelektroden<sup>[109, 110]</sup> wurden neue Möglichkeiten der Immobilisierung gesucht, um „reagenzlose“ (alle benötigten Reagenzien sind immobilisiert) und stabile Sensoren zu entwickeln. Die Mediatoren werden durch Co- oder Elektropolymerisation in Polymere integriert.<sup>[94, 111, 112]</sup> Eine Vielzahl von Redoxpolymeren wurde bereits synthetisiert und für die verschiedensten Anwendungen charakterisiert. Mittels Elektropolymerisation wird Toluidin Blau O auf einer Glaskohlenstoff-

Elektrode abgeschieden und zur Elektrooxidation von NADH eingesetzt.<sup>[112]</sup> Meldola Blau wird in ein Siloxanpolymer integriert, um ein „Ausbluten“ des Mediators zu verhindern.<sup>[94]</sup>

Übergangsmetallkomplexe zeigen geringe, pH-unabhängige Redoxpotentiale. Heller führte die Verwendung von flexiblen, hydrophilen Polymeren mit Osmium-Redoxeinheiten ein. Diese flexiblen Ketten können in das aktive Zentrum des Enzyms gelangen und damit die Enzyme mit der Elektrode verbinden („wiring“).<sup>[113]</sup>

Die Anforderungen an die Mediatoren lauten: a) ein adäquates Redoxpotential als Triebkraft für eine vollständige Umsetzung, b) Stabilität über längere Zeit in beiden Redoxformen, c) schnelle und selektive Reaktion mit dem Cofaktor und d) eine reversible Reaktion an der Elektrode.

### **Ferrocen (Fc)**

Ferrocen ist der bekannteste Cyclopentadienyl-Komplex (CP) durch seine 18 Valenzelektronen bildet Fc einen stabilen Komplex (Abb. 16). Das Cyclopentadien-Anion ist ein Hückel-Aromat mit einem  $\pi$ -Elektronensextett. Die  $\pi$ -Elektronen können mit den leeren d-Orbitalen von Übergangsmetallen überlappen.<sup>[88]</sup> Die CP-Ringe liegen im Ferrocen „auf Deckung“, d.h. in gleicher Orientierung, das Eisen hat hier die formale Oxidationszahl +2. Fc ist ein 1e-Überträger. Die Fähigkeit von Fc als 1e-Überträger Elektronen zwischen einem 2e-2H-übertragenden Enzym und einer Elektrode zu überführen, wird in vielen Biosensoren beschrieben.<sup>[91, 114, 115]</sup> Der Fc-Komplex wird durch die Reaktion mit dem Enzym reduziert und anschließend durch die Elektrode wieder oxidiert (Abb. 16). Zur Variation von Löslichkeit, Reaktivität, Ladung und Redoxpotential des Moleküls kommen verschiedenste Derivate zum Einsatz.



**Abb. 16** Strukturformeln von Cyclopentadien und Cyclopentadienylanion und Redoxverhalten von Ferrocen(-derivaten)

Ferrocenderivate werden als frei diffundierende Mediatoren,<sup>[116]</sup> als selbstassemblierte Monoschichten (SAM) an Goldoberflächen,<sup>[27, 117-119]</sup> als Ferrocen-substituierte, elektropolymerisierbare Thiophene,<sup>[120]</sup> an Carbonnanotubes<sup>[121]</sup> oder in Redoxpolymeren

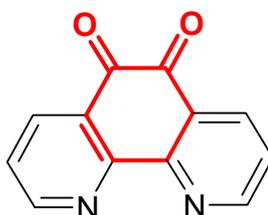
immobilisiert<sup>[122-125]</sup> eingesetzt. Die Redoxpotentiale liegen dabei zwischen + 100 und + 400 mV (vs. Ag|AgCl).

Eine Verschiebung des Redoxpotentials zu positiveren Werten zeigt sich bei steigenden Fc-Anteilen coimmobilisierter Ferrocenylalkanthiol- und Alkanthiol-Monoschichten an Goldelektroden. Die Fc-Einheiten bilden Cluster mit benachbarten Einheiten bei hohen Fc-Anteilen, während sie bei geringeren Anteilen isoliert vorliegen.<sup>[27, 117, 118]</sup> Zur Bildung von Redoxpolymeren für den Einsatz in Glucose-Sensoren werden verschiedene Fc-Derivate mit verschiedenen Monomeren copolymerisiert<sup>[122-125]</sup>.

Der bewährte Mediator Ferrocen sollte in dieser Arbeit in die Redoxpolymere integriert werden. Er bietet eine verlässliche Möglichkeit den Einfluss der anderen Faktoren, wie der Oberflächenimmobilisierung und Polymergerüst, zu charakterisieren.

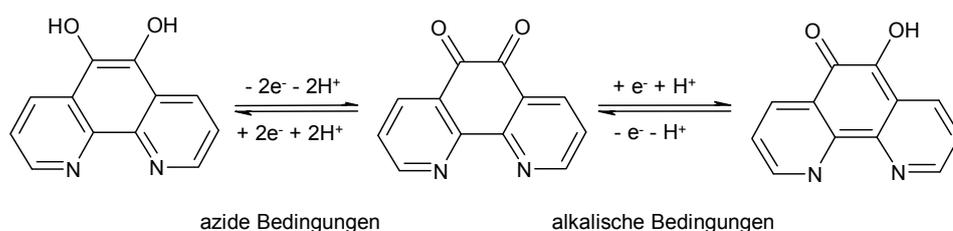
### **1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (PD)**

Das 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (PD) ist ein Pyridinsubstituiertes *ortho*-Chinon-Derivat (Abb. 17). Chinone leiten sich von Benzol oder mehrkernigen aromatischen Kohlenwasserstoffen ab. Es sind gelb-, orange- oder rotgefärbte Dioxoverbindungen. Die Ketogruppen in Chinonen sind im Allgemeinen *ortho*- oder *para*-ständig. *Meta*-Chinone sind instabil und können nicht als Reinsubstanzen isoliert werden.



**Abb. 17** Strukturformel des 1,10-Phenanthrolin-5,6-dions mit dem *o*-Chinon-Anteil (rot)

Mit mindestens zwei konjugierten C=C-Doppelbindungen bilden die Chinone ein chromophores System aus. In der Natur spielen sie eine wichtige Rolle als Elektronen- und Protonenüberträger, z.B. in der Atmungskette oder Photosynthese oder als Coenzyme wie das PQQ. Ebenso wie andere Chinone agiert 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (unter aziden Bedingungen) als 2e-2H-Überträger (Abb. 18). Unter neutralen oder alkalischen Bedingungen wirkt das PD als 1e-1H-Überträger und wird nur bis zum Semichinon reduziert.<sup>[126, 127]</sup>



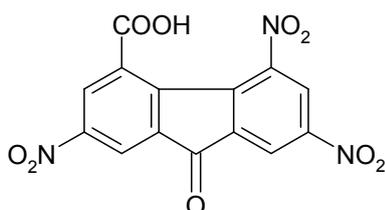
**Abb. 18** Reversible Reduktion von 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (modifiziert nach <sup>[127]</sup>)

Verschiedene Chinone, wie *p*-Benzochinon oder Naphthochinon, werden bereits in der Elektrochemie verwendet.<sup>[128-130]</sup> Ein Nachteil dieser Substanzen sind ihre reaktiven Doppelbindungen. Die aromatischen Systeme können Additionsreaktionen, wie die Diels-Alder-Reaktion, eingehen. Das PD bietet den Vorteil weniger reaktiv zu sein, da der mittlere, chinoide Ring kein freies, reaktives Elektronenpaar aufweist. Vorteil der zwei Pyridinringe ist die Möglichkeit zur gezielten Modifizierung.<sup>[127]</sup>

Die Stickstoffatome des PD können alkyliert werden oder der Metallkoordination dienen. *N*-methyliertes PD wird bereits für die Elektrooxidation von NADH verwendet.<sup>[28, 127]</sup> Als Zentralatome für die einkernigen Koordinationsverbindungen können u.a. Eisen, Nickel, Cobalt, Ruthenium oder Osmium verwendet werden.<sup>[131-134]</sup> Dabei entstehen oktaedrische Komplexe mit sechs Liganden, Ruthenium bildet stabilere Komplexe aus als Osmium. Homo- und Heterokomplexe von PD-Derivaten und *N,N,N*-Tris(pyridylmethyl)amin werden in Lösung oder im Polymer verankert eingesetzt. Die Redoxpotentiale liegen bei + 50 und + 150 mV (Ag|AgCl).<sup>[28, 127, 131]</sup> Ebenso sind Mischmetallkomplexe aus PD und bpy mit Osmium oder Ruthenium bekannt.<sup>[135, 136]</sup> Ähnlich zu den Phenanthrolindion-Komplexen werden bpy-Metall-Komplexe als Mediatoren eingesetzt.<sup>[136-139]</sup> Im Gegensatz zu den PD-Metall-Komplexen agiert dabei das Zentralatom als Mediator und nicht der Ligand. Diese Mediatorkomplexe fungieren im Gegensatz zu PD als 1e-Überträger.

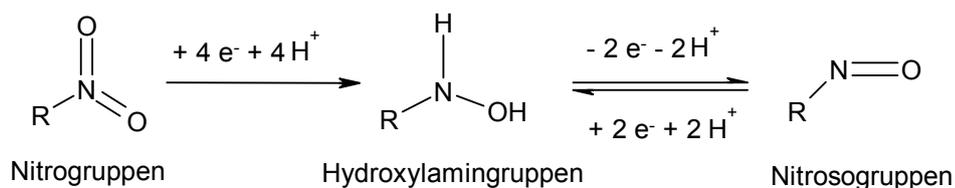
#### 4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenon (CTF)

4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenon (CTF) (Abb. 19) und seine verschiedenen Derivate sind bekannte Redoxmediatoren für die elektrochemische Oxidation von NADH.<sup>[140-148]</sup>



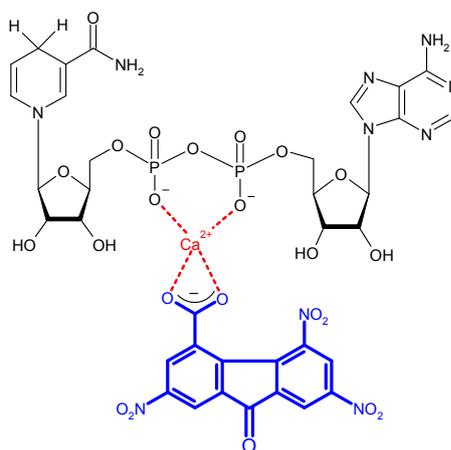
**Abb. 19** Strukturformel des 4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenon (CTF)

Die Nitrogruppen müssen irreversibel zu Hydroxylamingruppen reduziert werden und bilden dann den elektronenübertragenden Teil im Molekül. Sie können reversibel in einem 2e-2H-Transfer oxidiert werden (Abb. 20).<sup>[26, 144, 146, 147, 149]</sup> Laut Mano und Kuhn wird durch das CTF sogar ein Hydridtransfer dem 2e-2H-Transfer vorgezogen, vorteilhaft für NAD-Enzyme. Durch die Entstehung einer partiellen positiven Ladung am Stickstoffatom der Nitrosogruppe kann diese sich mesomer stabilisieren.<sup>[26]</sup>



**Abb. 20** Reaktionsschema für die Aktivierung und reversible Oxidation/Reduktion der Nitrogruppen des CTF modifiziert nach <sup>[146]</sup>

Die Anzahl der Nitrogruppen am Ringsystem beeinflusst das Redoxpotential des Mediators. Mit steigender Nitrogruppenanzahl verschiebt sich das Redoxpotential zu positiveren Werten.<sup>[26]</sup> Das CTF bildet einen Komplex mit dem NADH über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Brücke des Pyrophosphates mit der Carboxylgruppe (Abb. 21).<sup>[140-148, 150, 151]</sup> Der Calciumeffekt wird durch die Aktivierung von zwei Nitrogruppen zu Hydroxylamingruppen, durch eine stabilisierende Wirkung noch verstärkt.<sup>[140, 146]</sup>

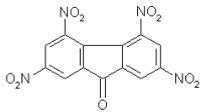
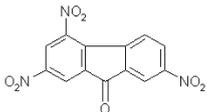
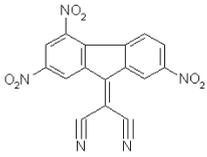
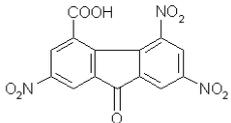
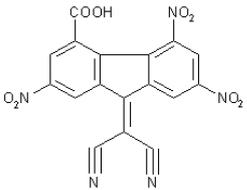
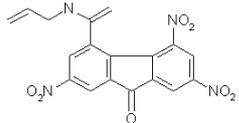


**Abb. 21** Schema der Komplexbildung von CTF (blau) und NADH (schwarz) über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Koordination (rot), modifiziert nach <sup>[140]</sup>

Ein Überblick über bisherige Arbeiten mit 2,4,7-Trinitro-9-fluorenol und seinen Derivaten ist in Tabelle 2 dargestellt. Für den immobilisierten Mediator auf Glaskohlenstoff-Elektroden werden Elektrooxidationspotentiale für NADH von ca.  $-50$  mV (Ag|AgCl) erzielt. An Gold-

und Zirconiumphosphat-Kohlenstoffpaste-Elektroden werden positivere Werte erzielt (+ 25 bis + 350 mV). Redoxpolymere mit CTF-Derivaten als Redoxzentren wurden bisher noch nicht beschrieben und sollen in dieser Arbeit hergestellt werden.

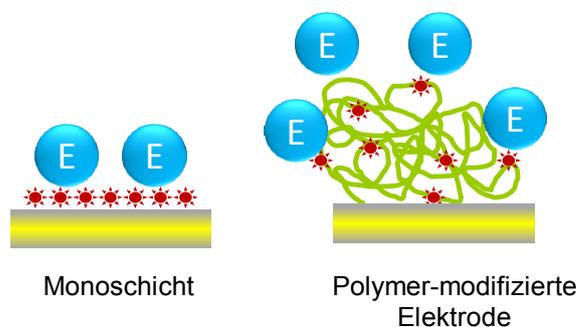
Tabelle 2 Literaturüberblick für Nitrofluorenone und Derivate

Substanz	Elektrooxidation bei E / mV vs. Ag/AgCl				Literatur
	GCE	CPE	Gold	Pt	
2,4,5,7-Tetranitro-9-fluorenon 	-50				[26]
2,4,7-Trinitro-9-fluorenon 	-50	+250(ZP)			[26]
	-50	+330 (ZP)			[149]
					[152]
(2,4,7-Trinitro-9-fluorenyl)malononitril 			+25		[152]
4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenon 	-45				[146]
	-30				[147]
	-20				[141]
	0				[140]
		+350(ZP)			[143]
		-50			[145]
(4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenyliden)malononitril 	~ 0				[148]
			-50		[150]
			+50		[142]
			-50		[145]
			~ 0		[151]
			+120		[144]
4-(N-allylamido)-2,5,7-Trinitro-9-fluorenon 				+10	[152]

GCE = Glaskohlenstoff-Elektrode, CPE = Kohlenstoffpaste-Elektrode, ZP = Zirconiumphosphat, Pt = Platin, PLL = Poly-L-Lysin, QCM = Quarzkristallwaage

Die Auswahl an Redoxmediatoren ist weitaus größer als hier beschrieben. Ein Potentialbereich von – 300 bis + 400 mV (Ag|AgCl) wird durch die beschriebenen Mediatoren abgedeckt. Sie erfüllen teilweise die unter 1.2.3.2 genannten Anforderungen. Dennoch wird weiterhin nach maßgeschneiderten Redoxpolymeren für ausgewählte Enzyme für ein optimales Sensordesign gesucht.

Warum sollen überhaupt hydrophile Redoxpolymere eingesetzt werden? Durch die Verwendung von Polymeren mit fixierten Redoxzentren können stabile Sensoren erhalten werden, wodurch ein „Ausbluten“ und eine Elektrodenvergiftung durch Protein-Metall-Wechselwirkungen verhindert werden.<sup>[6]</sup> Der ET zwischen Enzym und Mediator wird durch die Interaktion des Cofaktors mit dem hydrophilen Polymer, analog zur natürlichen Umgebung, vereinfacht.<sup>[67]</sup> Die Hydratisierung verringert die lokale Viskosität und reduziert elektrostatische Wechselwirkungen, dadurch wird sowohl die Elektronendiffusion als auch die Permeabilität der wasserlöslichen Moleküle erhöht.<sup>[153]</sup> Ein Redoxpolymer bietet aufgrund seiner Struktur eine große Fläche. Durch die Ausnutzung der dritten Dimension wird eine größere Anzahl an möglichen Interaktionen für die in Lösung befindlichen Enzyme verglichen mit einer zweidimensionalen Mediatormonoschicht, erhalten (Abb. 22). In ein hydrophiles, dreidimensionales Polymer kann das Enzym eintauchen. Somit stehen sowohl oberflächliche als auch tiefliegende Redoxzentren für den ET zur Verfügung.



**Abb. 22** Mediatormonoschicht- und polymermodifizierte Elektrodenoberflächen in Wechselwirkung mit redoxaktiven Enzymen, blau: Enzym, grün: Polymer, rot: Mediator

Die ET-Wege vom Enzym zum Mediator und schließlich zur Elektrode werden durch eine Immobilisierung kurz gehalten. Gängige Immobilisierungsmethoden werden im Folgenden erläutert.

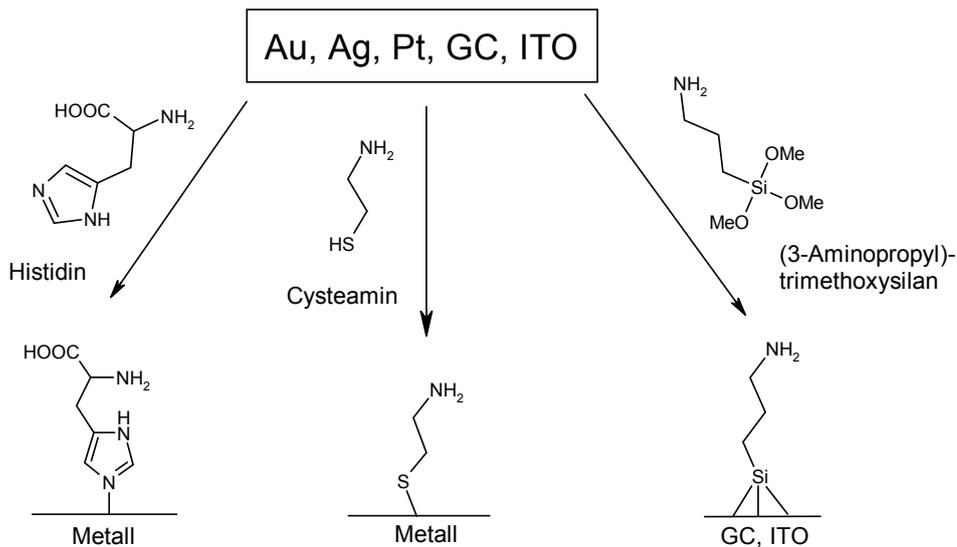
## 1.2.4 Chemisch-modifizierte Elektroden

Redoxaktive Substanzen, Biomoleküle oder Kombinationen werden *kovalent* oder *nicht-kovalent* auf Elektrodenoberflächen immobilisiert. Chemisch modifizierte Elektroden entstehen durch Aufbringen einer redoxaktiven Substanz auf die Oberfläche. Eine Anbindung der immobilisierten Moleküle ist eine wichtige Voraussetzung für die Gewährleistung der Wiederverwendbarkeit, Stabilität und Reproduzierbarkeit der Sensoren. Häufig verwendete Elektrodenmaterialien sind Gold (Au), Platin (Pt), Glaskohlenstoff (GC), Indiumzinnoxid (ITO) oder Kohlenstoffpasten (CP).

### 1.2.4.1 Kovalente Modifizierung

**Self-assembled Monolayers (SAM):** Gold- und Silberoberflächen lassen sich durch selbstorganisierende Prozesse kovalent mit Thiolen modifizieren. *n*-Alkanthiole und -disulfide adsorbieren spontan an Gold- und Silberoberflächen unter Ausbildung selbstassemblierter chemisorbierter Monoschichten (SAM). Thioalkylketten ( $\geq C_{11}$ ) ordnen sich parallel zueinander bzw. auf Gold parallel und um 30° Richtung Oberfläche geneigt, an,<sup>[154-156]</sup> u.a. werden thiolmodifizierte Mediatoren auf diese Weise immobilisiert.<sup>[157]</sup> Histidin bildet an Metalloberflächen ebenfalls chemisorbierte Monoschichten aus (Abb. 23).<sup>[158]</sup> Besitzen die immobilisierten Moleküle weitere exponierte Funktionalitäten, wie Aminogruppen, können sie die Ankopplung weiterer Moleküle ermöglichen.

**Silanisierung:** Eine kovalente Ankopplung verschiedener Moleküle an viele Elektrodenmaterialien ist über eine Silanisierung mit funktionellen Silanen möglich. Die Modifizierung von Elektrodenoberflächen mittels Silanisierung wurde erfolgreich an Elektrodenmaterialien, wie z.B. Zinnoxid, Titandioxid, Platin/Platinoxid, Kohlenstoff oder auch Gold, durchgeführt.<sup>[159]</sup> Silane mit funktionellen Endgruppen können für die anschließende Modifizierung mit elektroaktiven Substanzen verwendet werden. Transparente ITO-Elektroden sind Glasoberflächen, die mit einer dünnen Schicht ITO beschichtet sind. Diese finden Einsatz in der Elektrochemie bzw. der Spektroelektrochemie. Der Vorteil dieser transparenten Elektroden liegt in der gleichzeitigen Verwendung für elektrochemische als auch spektrometrische Experimente für farbige Mediatoren oder redoxinduzierte Farbveränderungen (Abb. 23).<sup>[160, 161]</sup>



**Abb. 23** Beispiele für die Bildung der kovalenten Schichten auf Silber- (Ag), Gold- (Au), Glaskohlenstoff- (GC), Indiumzinnoxid- (ITO) und Platin- (Pt) Elektroden

#### 1.2.4.2 Nicht-kovalente Modifizierung

**Physikalische Adsorption:** Diese Art der Elektrodenmodifizierung wird für die chemische Modifizierung von Elektroden, häufig Glaskohlenstoff-Elektroden, mit Redoxmediatoren oder -polymeren verwendet.<sup>[107, 140, 144, 162]</sup> Aber auch für Immobilisierungen von Enzymen aus wässrigen Lösungen zum anschließenden Einsatz in nicht-wässrigen Lösungsmitteln, findet die physikalische Adsorption Anwendung.<sup>[163]</sup> Die Elektrode wird in eine Lösung des zu immobilisierenden Moleküls getaucht. Das Molekül adsorbiert an der Oberfläche über elektrostatische und ionische Wechselwirkungen.

**Layer-by-Layer-Technik (LbL):** Moleküle entgegengesetzter Ladung können mit dieser Methode schichtweise auf Oberflächen immobilisiert werden. Hierbei wird die elektrostatische Anziehung entgegengesetzt geladener Polyionen ausgenutzt. Ein Träger wird abwechselnd in Lösungen der verschiedenen Polyionen inkubiert. Dadurch wird alternierend die Ladung der Oberfläche geändert. Auf diese Weise lassen sich unterschiedlichste, polyionische Moleküle immobilisieren.<sup>[164-167]</sup> Häufig verwendete Polyelektrolyte sind Poly(styren sulfonsäure), Poly(allylamin), Poly(ethylenimin) und Poly(acrylsäure). Dabei können Partikel oder Moleküle „verkapselt“, oder Schichten auf planaren Oberflächen gebildet werden. In diese Schichten lassen sich Biomoleküle aufgrund ihrer eigenen Oberflächenladung integrieren. Die Vorteile dieser Methodik liegen in dem selbstassemblierenden Aufbau und der einfachen Strukturierung der Schichten durch die entsprechende Wahl der Inkubationsparameter (pH-Wert, Ionenstärke). Nachteilig sind die Anfälligkeit der Biomolekül-enthaltenden Schichten gegenüber veränderten Ionenstärken und der daraus folgenden Destabilität, sowie der Einfluss eines Trocknungsprozesses auf die

Multischichten.<sup>[168]</sup> Die Möglichkeit, diese Schichten oder Kapseln selektiv zu öffnen, beispielsweise durch eine pH-Änderung oder die kontrollierbare Durchlässigkeit der Schichten für kleine Moleküle macht diese Methode für den Einsatz im „drug delivery“ interessant. Diese Methode wird z.B. zum Aufbau von Cytochrom c-Multischichtelektroden eingesetzt. Alternierende Schichten aus Cytochrom c und Poly(anilinsulfonsäure) werden auf die Elektroden aufgebracht. Diese Elektroden werden für die Detektion von Antioxidanzien oder Superoxid eingesetzt.<sup>[169, 170]</sup>

**Kohlenstoffpaste-Elektroden (CPE):** Die Immobilisierung von Mediatoren und Enzymen in CPE ist ebenfalls weit verbreitet. Es werden Enzyme, Enzyme in Kombination mit Mediatoren oder Redoxpolymeren in den Pasten immobilisiert.<sup>[96, 108, 171]</sup> Die verschiedenen Substanzen werden durch einfaches Mischen mit dem Graphitpulver und Paraffinöl leicht und kostengünstig integriert.

**Elektropolymerisierung:** Aus Monomeren werden durch eine angelegte Spannung Radikale gebildet, die mit weiteren Monomeren reagieren und somit polymere Strukturen bilden. Die Monomere können redoxaktive Gruppen tragen, wodurch Redoxpolymere gebildet werden. Das mechanische Einschließen von Enzymen in Polymere wurde in vielen Publikationen untersucht. Das Enzym wird bei der Elektropolymerisation direkt oder durch anschließendes Quervernetzen mit den Polymerketten mit bifunktionalen Quervernetzern (Glutaraldehyd, Poly(ethylenglykol)diglycidylether) eingeschlossen.<sup>[98]</sup> Der Vorteil ist die Möglichkeit miniaturisierte und komplexe Mikroelektroden und –arrays einzeln zu beschichten. Die Elektropolymerisation wird, aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der Monomere, vorwiegend in organischen Lösungsmitteln durchgeführt. Dieses wiederum ist ein großer Nachteil bei der Verwendung von Enzymen, da diese in organischen Lösungsmitteln denaturieren. Hohe Polymerisationspotentiale können ebenso zur Denaturierung der Enzyme führen. Die Elektropolymerisation von Mediatoren scheitert häufig an dem Fehlen polymerisierbarer Gruppen in den Monomeren. Dennoch gibt es einige Beispiele für die Polymediatoren wie z.B. Poly(vinylferrocen),<sup>[93, 172]</sup> Poly(methylengrün), -blau oder –rot.<sup>[173]</sup> Ein Copolymer aus  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$ -Pyridin-modifiziertem Pyrrolmonomer und Thiophen wird mittels Elektropolymerisation auf einer platinisierten Glaskohlenstoff-Elektrode abgeschieden. Die daran adsorbierte Pyruvatoxidase zeigt einen effizienten Elektrontransfer.<sup>[174]</sup>

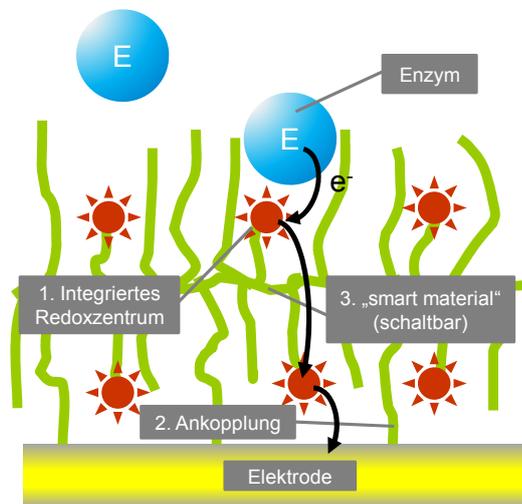
Die kovalente Ankopplung der redoxaktiven Spezies in den Polymeren und die Ankopplung der Redoxpolymere selbst auf Elektrodenoberflächen sind entscheidend für die reproduzierbare, einfache Herstellung „reagenzloser“, stabiler Biosensoren. Die polymermodifizierten Elektroden werden allerdings bisher vorwiegend über Adsorption bzw. Elektropolymerisation hergestellt und damit nicht-kovalent immobilisiert. Es entstehen zwar relativ stabile Polymerschichten, aber unbekannter Orientierung und Struktur. Eine kovalente

Ankopplung verspricht größere Stabilität und eine reproduzierbare Herstellung der Elektroden. Es können dünne Polymerschichten gebildet werden. Zusätzlich können weitere Funktionen integriert werden, welche z.B. eine Kontrolle des elektrochemischen Signals und damit die einzelne Ansprechbarkeit verschieden funktioneller, parallel angeordneter Elektroden ermöglichen können (Abb. 1, S. 2). Eine Schaltbarkeit der Redoxaktivitäten der Polymere durch eine Strukturveränderung über externe Stimuli könnte dazu eingesetzt werden.

## 2. Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung neuer Redoxhydrogele mit drei verschiedenen funktionellen Eigenschaften zur elektrochemischen Kontaktierung von **Oxidoreduktasen** (Abb. 24):

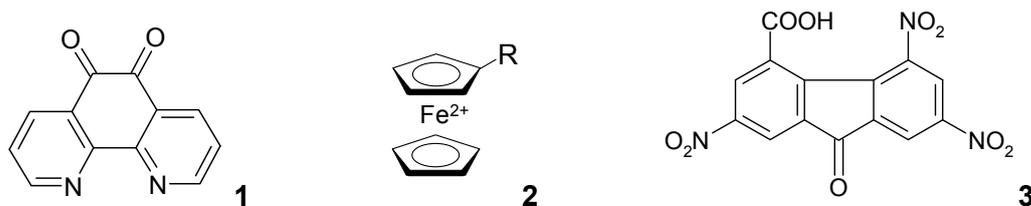
1. **kovalent** integrierte Redoxzentren in einer hydrophilen Polymermatrix,
2. reaktive **Kopplungsgruppen** zum Aufbau selbstassemblierter Polymerschichten auf Elektrodenoberflächen und
3. **schaltbare** Redoxaktivitäten der Polymere über extern gesteuerte Strukturänderung.



**Abb. 24** Schema einer Hydrogelmodifizierten Elektrode mit kovalent integrierten Redoxzentren zur Kontaktierung von redoxaktiven Enzymen

Drei verschiedene Mediatoren sind als Redoxzentren vorgesehen: 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (PD **1**), Ferrocen (**2**), 4-Carboxy-2,5,7-trinitrofluorenon (CTF **3**) (Abb. 25). Sie bieten unterschiedliche Elektronentransferreaktionen (Ein-Elektron- oder Zwei-Elektronen-zwei-Protonen-Transfer) und ermöglichen ein Spektrum an Oxidationspotentialen von  $\sim 0$  bis  $+ 400$  mV (Ag|AgCl). Die Verwendung dieser unterschiedlichen Mediatoren soll die optimale Kontaktierung verschiedener redoxaktiver Enzyme (Oxidoreduktasen) ermöglichen und durch die irreversible Integration soll ein Ausbluten der Mediatoren vermieden werden.

Zur kovalenten Fixierung dieser Redoxzentren durch Copolymerisation müssen zunächst polymerisierbare Mediatormonomere für PD und CTF synthetisiert werden.



**Abb. 25** Strukturformeln der verwendeten Redoxmediatoren 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (1), Ferrocen (2) und 4-Carboxy-2,5,7-Trinitrofluorenon (3)

Die Redoxaktivitäten der Hydrogele sollen durch externe Stimuli reversibel kontrollierbar sein weshalb responsive Polymergerüste gewählt werden. Es sollen verschiedene Poly(ethylenglykol)- und Poly(*N*-Isopropylacrylamid)-basierte Redoxhydrogele mit Variationen in Art und Häufigkeit des Mediators, Kettenlänge und Ankopplungsgruppe durch möglichst einfache und effiziente Synthesewege synthetisiert werden. Die hydrophilen Polymerstrukturen ahmen die natürlichen Umgebungen der Enzyme nach und unterstützen die Interaktionen von Enzym und Redoxzentren.

Die reaktiven Kopplungsgruppen sollen durch kurzkettinge Thiol-, Amin-, Epoxy- und Disulfidgruppen in den Polymerseitenketten gebildet werden. Die Thiol- und Disulfidgruppen sind für die direkte Kopplung an Goldoberflächen über selbstassemblierte Schichten geeignet. Polymerisierbare Thiol- und Disulfidmonomere müssen zunächst synthetisiert werden. Die Amin- und Epoxygruppen können über externe Thiollinker (Cysteamin, 3,3'-Dithiodipropionsäure-*N*-Hydroxysuccinimidylester) an Goldoberflächen gebunden werden. Diese Ankopplungsart der Redoxhydrogele soll die Ausbildung flexibler, dreidimensionaler Polymermonoschichten und damit einen engen Kontakt zwischen dem aktiven Zentrum des Enzyms, dem Redoxzentrum und der Elektrode gewährleisten. Dadurch sollen kurze und effizientere Elektronentransferwege vom Enzym zur Elektrode erreicht werden.

Die synthetisierten Polymere sollen elektro- und physikochemisch hinsichtlich der Integration der Redoxzentren, der Ankopplung auf Elektrodenoberflächen und ihrer elektrochemischen Eigenschaften charakterisiert werden.

Es werden zwei verschiedene Oxidoreduktasen exemplarisch eingesetzt: Pyrrolochinolinchinon-abhängige Glucosedehydrogenase (PQQ-GDH) als PQQ-abhängiges und Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid-abhängige Glucosedehydrogenase (NAD-GDH) als NAD-abhängiges Enzym. Beide Enzyme unterscheiden sich in ihren Katalysemechanismen durch Verwendung unterschiedlicher Coenzymformen. Das PQQ ist eine koordinativ eingebaute, prosthetische Gruppe, während das NAD<sup>+</sup> ein frei diffundierendes Coenzym ist. Beide Enzyme setzen Glucose zu Gluconolacton um. Für diese Enzyme ist ein direkter heterogener Elektronentransfer zur Elektrode nicht möglich. Daher ist die Verwendung der

zusätzlichen Redoxzentren notwendig, um den Substratumsatz elektrochemisch zu detektieren.

Der ET von den Oxidoreduktasen über die verschiedenen Redoxpolymere zur Elektrode soll elektrochemisch charakterisiert werden. Das Polymer mit der optimalen Zusammensetzung soll für die zwei Enzyme ermittelt werden.

Schaltbare Redoxaktivitäten der Polymere sollen eine Kontrolle der Signalintensitäten ermöglichen. Durch externe Stimuli soll eine Strukturänderung der responsiven Polymere bewirkt und damit die Zugänglichkeit der Redoxzentren für die Enzyme kontrolliert werden.



### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Polymersynthesen und -charakterisierungen**

##### **3.1.1 Allgemeines**

Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese redoxaktiver, schaltbarer Hydrogele mit integrierten Redoxzentren und Kopplungsgruppen, zur elektrochemischen Kontaktierung von Oxidoreduktasen. In dem folgenden Kapitel werden zunächst die allgemeinen Synthesestrategien und Charakterisierungsmethoden und im Anschluss die speziellen Synthesen und Charakterisierungen der Polymere beschrieben.

##### **3.1.1.1 Allgemeine Synthesestrategien**

Die Redoxzentren der neuen Redoxpolymere sollten durch bekannte Mediatoren gebildet werden. Da nicht alle polymerisierbaren Monomere kommerziell erhältlich waren, wurden diese zunächst synthetisiert. Auch die polymerisierbaren, funktionellen Monomere zur Ankopplung an Elektrodenoberflächen mussten teilweise hergestellt werden.

Die Polymere wurden aus Vergleichbarkeitsgründen in ähnlichen molaren Verhältnissen synthetisiert. Die Eigenschaften des PNIPAM und des PEG, wie die Hydrophilie, das Temperaturverhalten oder auch die Wasserbindungskapazität sollten erhalten bleiben, aber auch die elektronenübertragenden Kollisionen der Redoxzentren miteinander sollten möglich sein.<sup>[19]</sup>

Das Temperaturverhalten und die Wasserbindungskapazität verändern sich durch das Einführen von hydrophilen oder hydrophoben Gruppen (siehe Kap. 1.2.3.1.). Die Mediatoren und Kopplungsgruppen stellen solche hydrophilen und hydrophoben Gruppen dar. Durch die Copolymerisation mit diesen Monomeren kann die LCST im Vergleich zum Homopolymer verschoben werden. Die Art der PEGMA-Monomere wurde so ausgewählt, dass sie laut Literatur eine mit PNIPAM vergleichbare LCST ergeben. Die eingesetzten Hydrogelmonomere entsprachen einem Anteil von 70 bis 80 %. Durch diese Anteile sollte die Veränderung der Copolymer-Eigenschaften im Vergleich zu Homopolymeren verhindert und eine effektivere Wechselwirkung der Enzymmoleküle mit den Redoxzentren erreicht werden. Der Mediator lag in den PNIPAM-Polymeren, in Anlehnung an die Literatur,<sup>[175]</sup> in einem Anteil von 1.5 % gegenüber den restlichen Monomeren vor, in den PEGMA-Polymeren betrug der Anteil 14.5 %. Hohe Mediatormengen können ein „Clustern“ der Mediatoreinheiten, wie bei Ferrocen-selbstassemblierten Monoschichten (Fc-SAM), verursachen, was sich z.B. in der Erhöhung der Redoxpotentiale äußert.<sup>[27, 117, 118]</sup> Allgemein werden Monomeranteile von 50 % oder 10 % verwendet, aber auch Anteile von 3 % oder

2 % werden beschrieben.<sup>[28, 114, 131, 137, 175-179]</sup> Durch die Verwendung von hydrophilen Redoxpolymeren wird durch die Ausnutzung der dritten Dimension allgemein eine Vergrößerung der Oberfläche und damit auch der zugänglichen Mediatormenge im Vergleich zu einer Monoschicht erreicht. Ein hoher Mediatoranteil von 50 % im Polymer ist daher möglicherweise nicht notwendig. Die optimale Mediatormenge in den Polymeren sollte ermittelt werden.

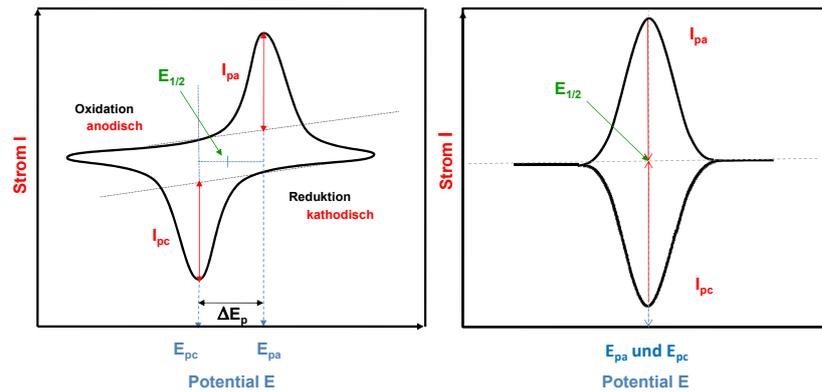
Die Ankopplungsgruppen für die Immobilisierung der Polymere auf den Goldelektroden wurden durch interne Thiol-, Disulfid-, Epoxy- oder Aminogruppen in einem Anteil von 21 % (PNIPAM) bzw. 14.5 % (PEGMA) dargestellt. Die Thiol- und Disulfidgruppen können direkt, die Amino- und Epoxygruppen über externe Schwefelgruppen zur Modifizierung von Goldelektroden eingesetzt werden. Die Amino- und Epoxygruppen stünden weiterhin der Anwendung von Amin-funktionalisierten oder carboxylierten Oberflächen, z.B. silanisierte Indiumzinnoxid- (ITO) oder Glaskohlenstoff-Elektroden zur Verfügung.

### **3.1.1.2      *Allgemeines zu den physikochemischen und elektrochemischen Charakterisierungen***

Die erhaltenen Polymere wurden physikochemisch und elektrochemisch hinsichtlich der Mediatorintegration, der Oberflächenmodifizierung und der Redoxeigenschaften charakterisiert.

Die Molekulargewichte der Polymere wurden mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) ermittelt. Die Integration der Redoxzentren in den Polymeren wird über UV / Vis-Spektrometrie, durch Vergleiche mit den Mediatorspektren, bestätigt.

Die elektrochemische Charakterisierung der Polymere erfolgte über Cyclische Voltammetrie (CV) und Square-Wave-Voltammetrie (SWV). In Abb. 26 sind typische Cyclische Voltammogramme und die auswertbaren Parameter für diffusionsabhängige (Redoxspezies in Lösung) und oberflächengebundene (immobilisierte Redoxspezies) Redoxprozesse dargestellt.



**Abb. 26** Schema typischer Cyclischer Voltammogramme für diffusionsabhängige (links) und diffusionsunabhängige (rechts) Redoxprozesse und der auswertbaren Parameter;  $I_{pa}$  und  $I_{pc}$ : anodischer und kathodischer Peakstrom;  $E_{pa}$  und  $E_{pc}$ : anodisches und kathodisches Peakpotential;  $\Delta E_p$ : Peakseparation;  $E_{1/2}$ : Halbstufenpotential

Cyclische Voltammogramme immobilisierter Redoxspezies zeichnen sich durch eine symmetrische Form der oxidativen und reduktiven Graphen, die Proportionalität des Peakstroms zur Scanrate und kleine Peakseparationen aus. Hiervon abweichende Kurvenverläufe können sich aus Abstoßungskräften, der unterschiedlichen räumlichen Verteilung der Redoxzentren oder aus der Verteilung von Redoxspezies mit unterschiedlichen Mikroumgebungen in oberflächennahen oder -ferneren Schichten ergeben.<sup>[180]</sup>

Aus den cyclischen Voltammogrammen wird das Halbstufenpotential  $E_{1/2}$ , die Peakseparation  $\Delta E_p$  und die Oberflächenbelegung  $\Gamma$  nach Gleichung 8, 9 und 10 bestimmt. Das Halbstufenpotential entspricht, bei angenommener gleicher Konzentration an oxidiertem und reduziertem Spezies, dem Redoxpotential der Substanz. Die Peakseparation gibt Auskunft über die Art, reversibel oder irreversibel, des Elektronentransferprozesses. Ist der Wert der Peakseparation  $\sim 0$  mV handelt es sich um einen reversiblen Redoxprozess für immobilisierte Mediatoren, ist der Wert größer liegt ein quasi-reversibler Prozess vor.

$$E_{1/2} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (8)$$

$$\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| \quad (9)$$

$$\Gamma = \frac{Q}{z \cdot F \cdot A} \quad (10)$$

$E_{pa}$  und  $E_{pc}$  beschreiben das Potential des anodischen und kathodischen Peaks – die Peakpotentiale. Die Oberflächenbelegung  $\Gamma$  der Elektrode lässt sich aus der Ladung  $Q$ , über die Integration des Stroms nach der Zeit aus dem Oxidations- bzw. Reduktionspeak

berechnen.  $F$  bezeichnet die Faraday-Konstante,  $A$  die Elektrodenfläche und  $z$  die Anzahl der während der Reaktion übertragenen Elektronen. Laut Literatur liegt der Wert für  $\Gamma$  für dünne, elektroaktive Polymerfilme zwischen  $10^{-11}$  und  $10^{-9}$  mol cm<sup>-2</sup>.<sup>[180]</sup>

Die Geschwindigkeitskonstante für den heterogenen Elektronentransfer (vom Mediator zur Elektrode)  $k_s$  wird nach der Methode von Laviron aus der Peakseparation bestimmt.<sup>[181]</sup>

Aus der Variation der Vorschubgeschwindigkeiten (Scanraten, SR) können Aussagen über die Oberflächenbeschaffenheiten ( $I_p \sim \nu$  oder  $I_p \sim \nu^{1/2}$ ) getroffen werden. Für immobilisierte Redoxspezies ist der Peakstrom proportional zur SR. Die Modifizierung der Elektrodenoberfläche wird damit bestätigt. Liegt eine lineare Abhängigkeit des Peakstroms von der Wurzel der SR vor, gilt die Randles-Sevcik-Gleichung (11) und es handelt sich um einen diffusionsabhängigen Prozess.

$$I_p = 0.4463 z F A C \left( \frac{z F \nu D}{RT} \right)^{1/2} \quad (11)$$

Dabei stellen  $z$  die Anzahl der Elektronen,  $F$  die Faraday-Konstante,  $A$  die Elektrodenfläche,  $C$  die Analytkonzentration,  $\nu$  die Scanrate,  $D$  der Diffusionskoeffizient,  $R$  die allgemeine Gaskonstante und  $T$  die absolute Temperatur dar.

Weiterhin werden Kontaktwinkelmessungen zur Bestätigung der Oberflächenmodifizierung herangezogen. Die Kontaktwinkelmessungen werden auf modifizierten Golddeckgläsern durchgeführt, die analog zu den Elektroden modifiziert wurden. Sie lassen eine Aussage über die Hydrophilie der Elektrodenoberfläche zu (25°: vollständig benetzt; 50°: hydrophil; 100°: hydrophob<sup>[182]</sup>). Eine Änderung des Kontaktwinkels im Vergleich zu unmodifiziertem Gold bestätigt die Modifizierung.

In dieser Arbeit liegt der Fokus u.a. auf der Ankopplung der Polymere an Elektrodenoberflächen um reproduzierbare, stabile Elektrodenoberflächen zu etablieren, die in kommerziellen Biosensoren Anwendung finden könnten. Aus diesem Grund wurde in der Charakterisierung auch auf die Lagerstabilität eingegangen. Die Elektroden wurden zwischen den Messungen trocken bei Raumtemperatur gelagert. Es wurden an verschiedenen Tagen cyclische Voltammogramme aufgezeichnet und die Änderung der Peakströme und Peakpotentiale ausgewertet. Die Konzentrationsabnahme des Mediators an der Oberfläche führte zu einer Abnahme des Peakstroms. Das Peakpotential kann sich verschieben, wenn durch geringere Mediatormengen das Aggregieren dieser Moleküle verhindert wird.<sup>[27]</sup>

Für die thermoresponsiven Polymere wird die LCST in Wasser bestimmt. Unterhalb der LCST binden die Polymere Wasser und sind hydratisiert, oberhalb der LCST wird das Wasser entfernt, sie sind dehydratisiert. Wie schon in Kap. 1.2.3.1. beschrieben, kann die

Einführung von hydrophilen oder hydrophoben Gruppen die LCST verschieben. Die Copolymerisation mit den Mediator- und Ankopplungsmonomeren könnte einen Einfluss auf die LCST haben. Die Länge der PEG-Seitenketten bestimmt ebenso die LCST.<sup>[79]</sup> Eine Verschiebung der LCST zu höheren Temperaturen wäre von geringer Auswirkung auf die weiteren Experimente, da diese bei Raumtemperatur (20°C) durchgeführt werden.

Bei den untersuchten Enzymreaktionen werden Protonen frei, welche die Veränderung des Halbstufenpotentials mit zunehmender Protonenkonzentration hervorrufen könnten. Eine Verringerung des Redoxpotentials um  $-58 \text{ mV/pH}$  (bei  $E^0$  konstant) würde ein typisches Verhalten entsprechend der Nernst-Gleichung (Gleichungen 12-14) bedeuten (Nernst-Verhalten). Die pH-abhängigen Potentialmessungen für diese Polymere wurden unter Einsatz von Puffern unterschiedlicher Zusammensetzung und pH-Werten durchgeführt.

$$E = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{[H^+]}{[H \uparrow]} \right) \quad (12)$$

$$E(20^\circ\text{C}) = E^0 + \frac{0.058 \text{ V}}{z} \log([H^+]) \quad (13)$$

$$E(20^\circ\text{C}) = E^0 + 0.058 \text{ V} \cdot \text{pH} \quad (14)$$

Die Charakterisierungsmethoden werden am Beispiel des ersten Polymers, PNIPAMFoxy, anhand gewonnener Graphen gezeigt. Für die weiteren Polymere werden die Ergebnisse genannt und ausschließlich signifikante Graphen gezeigt.

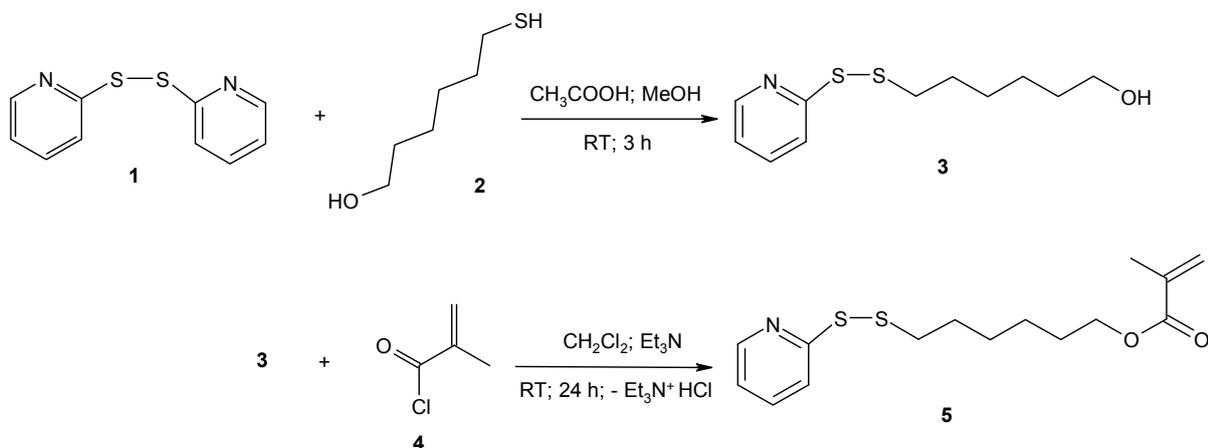
### 3.1.2 Kopplungsgruppen

Vier verschiedene Kopplungsgruppen für die Oberflächenmodifizierung wurden für die Polymere verwendet: Epoxy-, Amino-, Thiol- und Disulfidgruppen. Die polymerisierbaren Monomere für die Epoxygruppe (Methacrylsäure-2,3-epoxypropylester) und Aminogruppe (Allylamin) sind kommerziell erhältlich. Die polymerisierbaren Thiol- und Disulfid-enthaltenden Monomere mussten zunächst synthetisiert werden.

#### 3.1.2.1 Synthese von 6-(Pyridin-2-yl-disulfanyl)hexylmethacrylat (5)

Die polymerisierbare Thiolankereinheit war kommerziell nicht erhältlich und wurde synthetisiert. Hierzu wurde 2,2'-Dithiopyridin (1) mit 6-Mercapto-1-hexanol (2) und das entstandene 6-(Pyridin-2-yl disulfanyl)hexan-1-ol (3) im Anschluss mit Methacrylsäurechlorid (4) umgesetzt (Abb. 27). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde das bräunliche Öl (5) mit einer Ausbeute von 58 % isoliert und massenspektrometrisch bestätigt. 5 enthielt eine Pyridinthiol-Schutzgruppe, um Quervernetzungen durch Bildung von

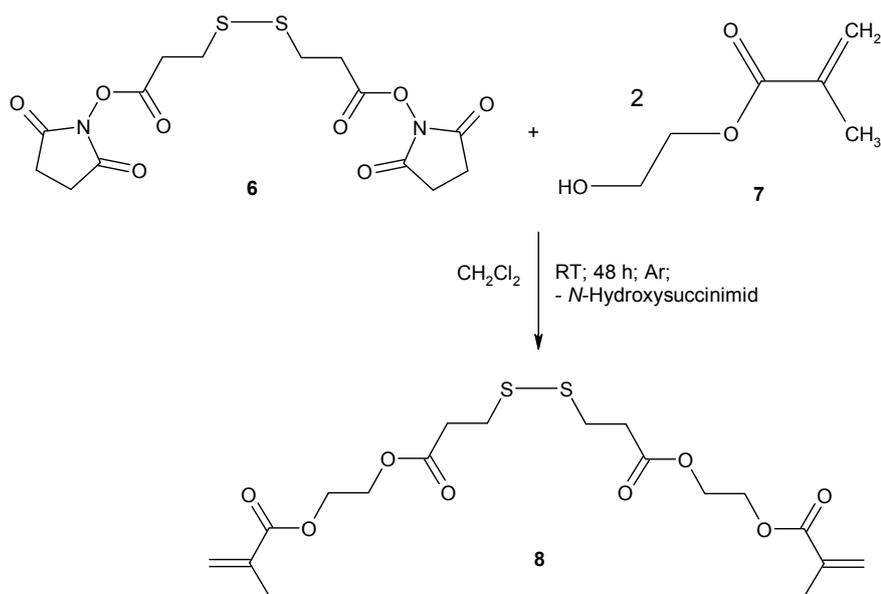
Disulfidbrücken während der Polymerisation zu vermeiden. Die Entschützung erfolgte direkt vor der Immobilisierung mit Tris(2-carboxyethyl)phosphinhydrochlorid (TCEP HCl).



**Abb. 27** Synthese 6-(Pyridin-2-yl-disulfanyl)hexylmethacrylat (5)

### 3.1.2.2 Synthese von Dithiodi((2-propanoyloxy)ethylmethacrylat) (8)

Eine zweite Ankopplungsstrategie sollte mit einem Disulfidderivat erfolgen. Um eine polymerisierbare Disulfidankergruppe zu erhalten, wurde 3,3'-Dithiodi(propionsäure-*N*-hydroxysuccinimidylester) (6) mit zwei Äquivalenten 2-Hydroxyethylmethacrylat (7) umgesetzt (Abb. 28). Als Produkt konnte ein weißes Pulver mit einer Ausbeute von 95 % isoliert werden. Die Struktur wurde mittels <sup>1</sup>H-NMR und Massenspektrometrie bestätigt.



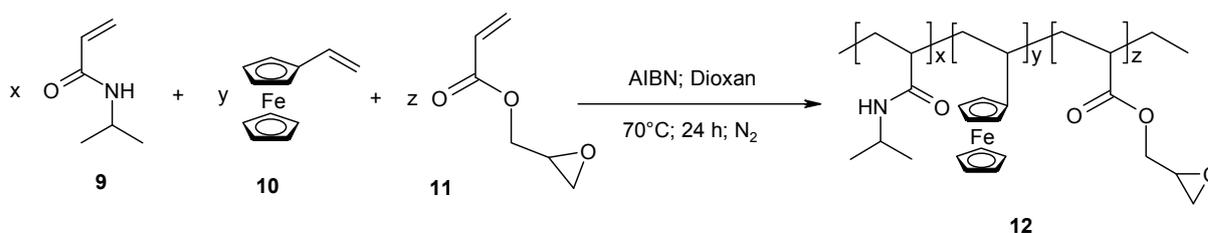
**Abb. 28** Synthese von Dithiodi((2-propanoyloxy)ethylmethacrylat) (8)

### 3.1.3 Ferrocen-Polymere

Ferrocen (Fc) und seine Derivate sind häufig genutzte Mediatoren in der Elektrochemie. Sie werden gelöst oder polymergebunden eingesetzt.<sup>[93, 117, 172]</sup> Das Redoxpotential liegt je nach Derivat und Polymergerüst bei +200 bis +500 mV (Ag|AgCl). Fc ist ein schneller 1e-Überträger und kann aufgrund der Geschwindigkeit des ET auch für 2e-2H-Übertragungen von Enzymen verwendet werden. Dieser Mediator wurde in die Polymere über Copolymerisation mit Vinylferrocen integriert.

#### 3.1.3.1 PNIPAMFoxy (12)

*N*-Isopropylacrylamid (9) (NIPAM), Vinylferrocen (10) und Methacrylsäure-2,3-epoxypropylester (11) wurden in einem molaren Verhältnis von 55:1:15 copolymerisiert (Abb. 29).<sup>[175, 176]</sup> Nach der Präzipitation und Reinigung mit Diethylether wurde 12 als gelbes Pulver in Analogie zur Literatur mit einer Ausbeute von 87 % isoliert.<sup>[175]</sup>

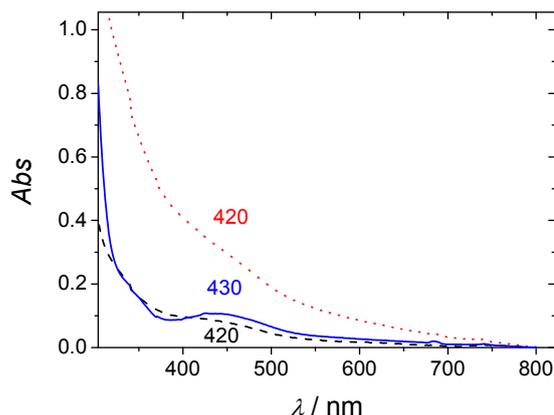


**Abb. 29** Synthese von PNIPAMFoxy (12); x:55; y:1; z:15

Das ermittelte, apparente Molekulargewicht betrug 36 kD und wies eine Polydispersität von 1.8 auf. Das deutet auf eine relativ einheitliche Verteilung der Polymerketten hin. Diese Werte stimmen mit vergleichbaren PNIPAM-Polymeren überein.<sup>[175]</sup>

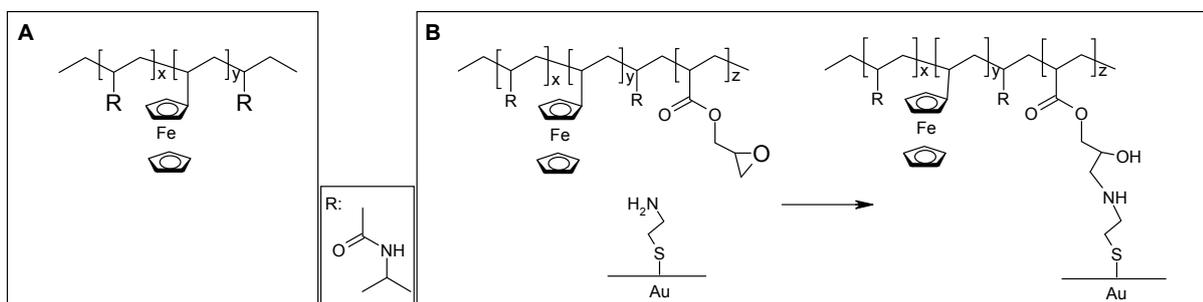
Ein Vergleichspolymer ähnlicher Zusammensetzung für Referenzexperimente wurde in gleicher Weise synthetisiert (PNIPAMF **12a**). Auf die Kopplungsgruppe wurde hier verzichtet. Dieses Polymer zeigte ein Molekulargewicht von 30 kD und eine Polydispersität von 1.7. Beide Werte stimmen mit denen des PNIPAMFoxy gut überein.

Die Absorptionsmaxima belegten mit 420 nm, und damit nur 10 nm Unterschied zum Monomer (430 nm), den integrierten Mediator (Abb. 30). Die geringe hypsochrome Verschiebung kann dem Unterschied im Lösungsmittel zugeschrieben werden. Vinylferrocen wurde aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit in DMSO gelöst.



**Abb. 30** Absorptionsspektren für PNIPAMFoxy (.....) und PNIPAMF (-----) in Wasser im Vergleich zu Vinylferrocen (—) in DMSO

Die Ankopplung von **12** über ein externes Cysteamin an eine Goldelektrode wurde in einer Scanratenabhängigkeit des Peakstroms untersucht. PNIPAMF hat keine Ankopplungsgruppe und wurde daher gelöst in Puffer untersucht. Die Ankopplung erfolgte wie in Abb. 31 dargestellt.



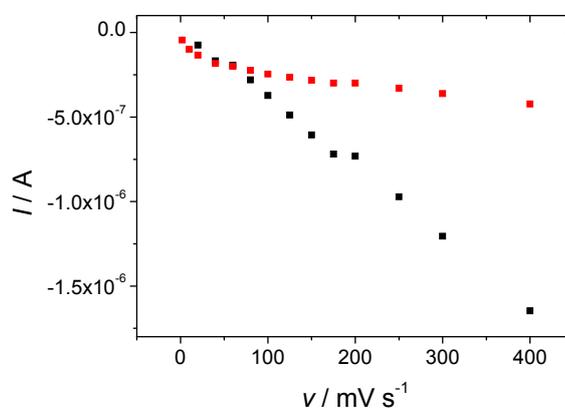
**Abb. 31** Schema des PNIPAMF- (A) (x: 70; y: 1) und PNIPAMFoxy-Polymeres und seiner Ankopplung an eine Goldoberfläche (B) (x: 55; y: 1; z: 15).

Die elektrochemische Charakterisierung ergab ein Halbstufenpotential ( $E_{1/2}$ ) von + 370 mV für PNIPAMFoxy mit einer Peakseparation ( $\Delta E_p$ ) von 40 mV. Es handelt sich um einen quasi-reversiblen Redoxprozess. Andere PNIPAM-Ferrocen-Polymere (~8 % Fc), ohne weitere copolymerisierte Gruppe, zeigen ein vergleichbares Redoxpotential von + 250 mV (Ag|AgCl).<sup>[70, 176]</sup>

Die Geschwindigkeitskonstante für den heterogenen ET wurde mit einem Wert von  $80 \text{ s}^{-1}$  bei einer Oberflächenbelegung von  $2.5 \cdot 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$  ermittelt. Damit erreicht sie einen mehr als doppelt so großen Wert wie die  $k_s$  für eine homogene, selbstassemblierte Monoschicht (SAM) aus 9-Mercaptononyl-5'-ferrocenylpentanoat mit  $\Gamma 4.2 \cdot 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ .<sup>[118]</sup> Das Polymer

mit einem eingesetzten Mediatoranteil von 1.5 % zeigte trotz seiner ca. 10fach kleineren  $\Gamma$  einen effektiveren ET als diese homogene Alkyl-Fc-Derivat-Schicht. Durch die Ankopplung des Polymers wird eine dünne Polymerschicht mit guter Zugänglichkeit der wenigen Mediatormoleküle auf der Elektrode erreicht, die einen kurzen ET-Weg und damit schnellen ET gewährleistet.

Die lineare Abhängigkeit des Peakstroms von der Scanrate für PNIPAMFoxy wies auf eine Diffusionsunabhängigkeit und damit der Immobilisierung hin. Die lineare Abhängigkeit des Peakstroms von der Quadratwurzel der Scanrate des in Lösung befindlichen PNIPAMF deutete, wie erwartet, nach der Randles-Sevcik-Gleichung (Gleichung 11) auf eine Diffusionskontrolle hin (Abb. 32).

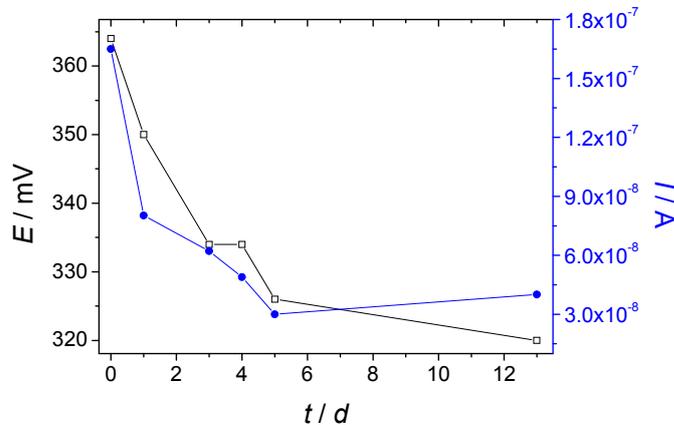


**Abb. 32** Abhängigkeiten der kathodischen Peakströme von der Scanrate für PNIPAMFoxy- (schwarz, linear) im Vergleich zu PNIPAMF- (rot, exponentiell) modifizierten Goldelektroden in HBS pH 7.5, RE: Ag|AgCl, GE: Platin

Die Ankopplung von PNIPAMFoxy an eine Goldoberfläche wurde weiterhin in einer Kontaktwinkelmessung bestätigt. Es wurde ein Kontaktwinkel von  $82^\circ$  bestimmt. Dieser Wert spricht für eine hydrophobere Oberfläche als unmodifiziertes Gold ( $70^\circ$ ).<sup>[182]</sup>

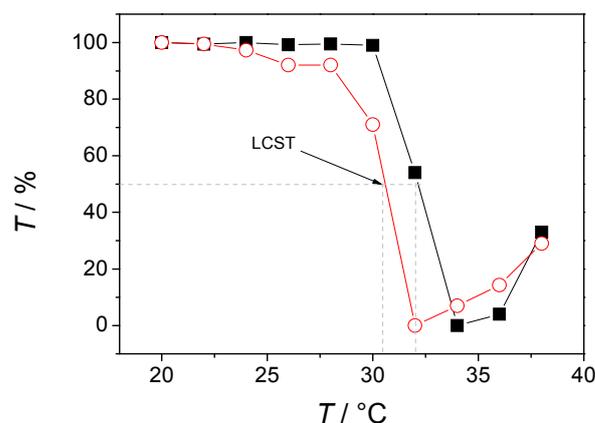
Die Lagerstabilität der angekoppelten Redoxpolymerschicht auf den Elektroden wurde über einen Zeitraum von 13 Tagen elektrochemisch untersucht. Zwischen den Messungen wurden die modifizierten Elektroden trocken bei Raumtemperatur gelagert. Innerhalb der ersten fünf Tage fiel sowohl das Stromsignal um 80 % (Abb. 33, -●-) als auch das Peakpotential um 10 % (Abb. 33, -□-) ab, anschließend blieben beide Werte relativ stabil. Der Abfall resultiert eventuell aus dem Herauslösen nicht fixierter Polymerketten aus dem Polymerfilm, welche durch das Spülen vor der Messung nicht vollständig entfernt wurden. Durch die wiederholte Verwendung der Elektroden kam es vermutlich zur Entfernung einiger und Neuordnung verbliebener Polymerketten. Das Resultat ist eine stabile Monoschicht des

Polymers, vergleichbar mit Ferrocen-SAM. Die sinkenden Strom- und Potentialwerte ergeben sich aus den geringeren Mengen an Ferroceneinheiten.<sup>[117]</sup>



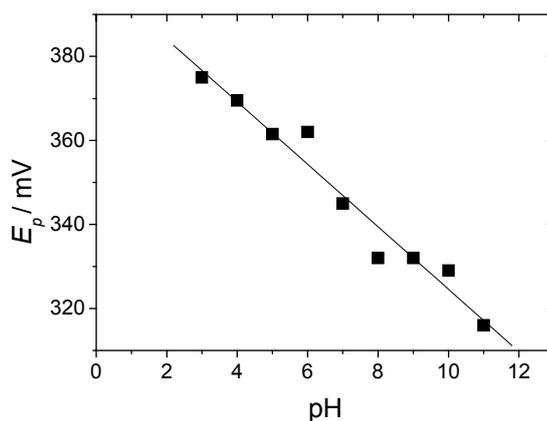
**Abb. 33** Stabilität des Peakpotentials (□) und der Peakströme (●) für PNIPAMFoxy-modifizierte Elektroden, in HBS pH 7.5, SR: 20 mV s<sup>-1</sup>, RE: Ag|AgCl, GE: Platin, Lagerung: trocken bei 20°C

Beide Polymere sind gut wasserlöslich bei Temperaturen < 25°C und thermoresponsiv. Für PNIPAMFoxy wurde in wässriger Lösung eine LCST von 30°C ermittelt (Abb. 34). Für das Vergleichspolymer PNIPAMF wurde eine unveränderte LCST im Vergleich zu reinem PNIPAM detektiert.<sup>[176, 183]</sup> Die Einführung von 1.5 % Ferrocen hat somit keinen Einfluss auf die LCST, der Anteil der Epoxygruppe von 21 % verringert sie dagegen leicht. Die Polymere liegen bei Raumtemperatur in hydratisiertem, gequollenem Zustand vor.



**Abb. 34** Transmissionsmessung zur Ermittlung der LCST von PNIPAMFoxy (○- 30°C) und PNIPAMF (■- 32°C)

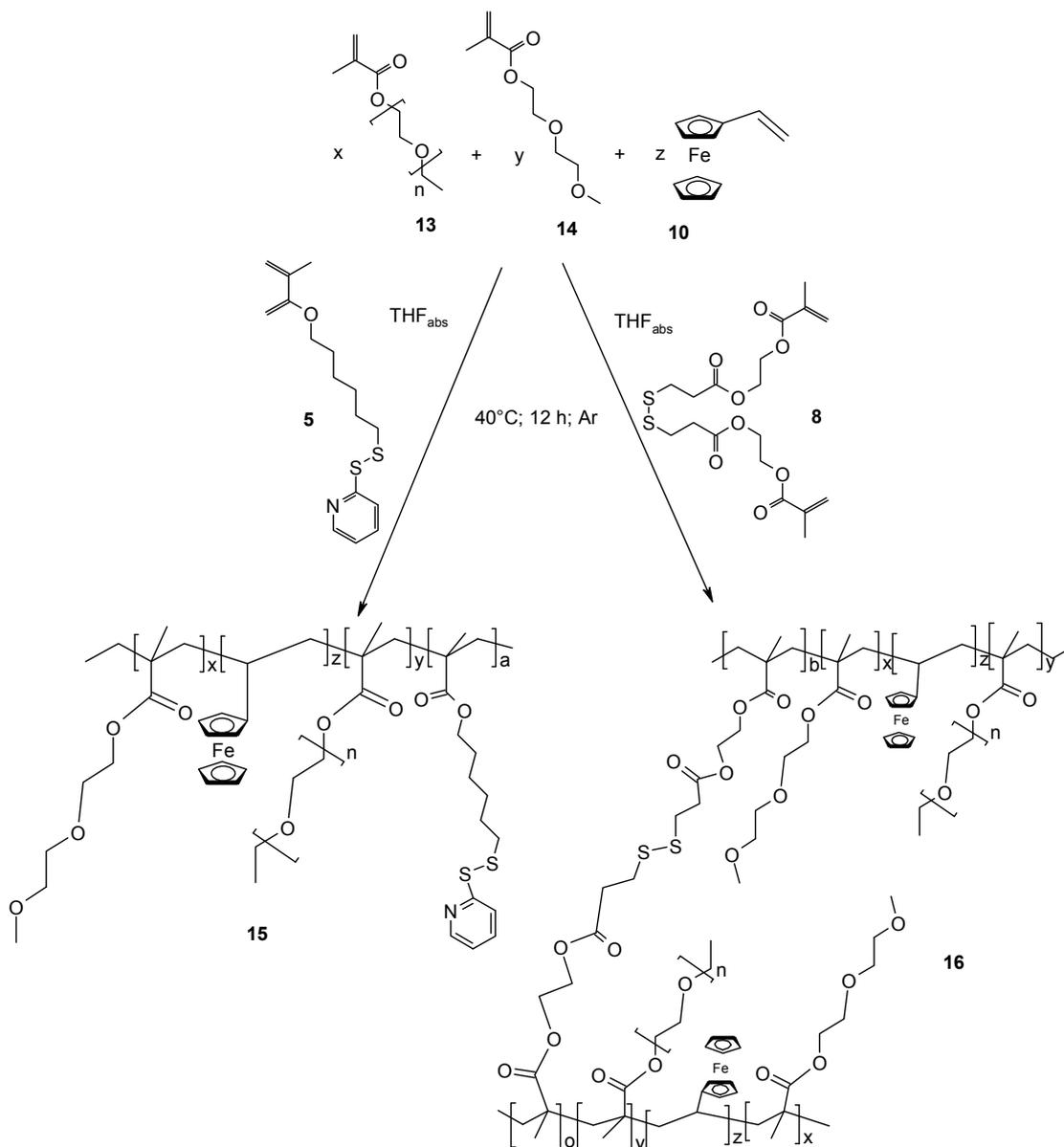
Das Peakpotential ( $E_p$ ) von PNIPAMFoxy sinkt um 7 mV/pH (Abb. 35) im pH-Bereich von 3 bis 11. Der Elektronentransfer von Ferrocen ist nicht an den Transfer von Protonen gekoppelt, weshalb eine pH-Abhängigkeit des Halbstufenpotentials nicht erwartet wird. Allerdings kann das umgebende PNIPAM-Polymer mit seiner Amidgruppe Wechselwirkungen mit Wasser, Hydroxidionen und Protonen eingehen, womit ein pH-Einfluss auf das elektrochemische Verhalten des Polymers zustande kommen könnte. Der ermittelte Wert ist allerdings gering im Vergleich zum Nernst-Verhalten (siehe Kap. 3.1.1.).



**Abb. 35** Abhängigkeit des Peakpotentials vom pH-Wert für PNIPAMFoxy-modifizierte Goldelektroden, SR. 20 mV s<sup>-1</sup> RE: Ag|AgCl, GE: Platin

### 3.1.3.2 PEGMA-Fc-SH (15) und PEGMA-Fc-SS (16)

Vinylferrocen (**10**) wurde mit Triethylglykolmonoethermethacrylat (**13**), Diethylglykolmethylethermethacrylat (**14**) und 6-(Pyridin-2-yl-disulfanyl)hexylmethacrylat (**5**) bzw. Dithio-((dipropanoyloxy)ethylmethacrylat) (**8**) copolymerisiert. Das Ergebnis war ein orangegelbes Öl **15** bzw. ein harzähnlicher orangefarbener Feststoff **16**. Beide Polymere wurden mit einer Ausbeute von ca. 90 % isoliert. Das PEGMA-Fc-SH ist ein lineares Polymer, da keine Seitenkettenpolymerisation auftreten kann, PEGMA-Fc-SS ist ein quervernetztes Polymer. Die intramolekularen Disulfidbrücken können verschiedene Polymerketten verbinden, wodurch eine Netzstruktur entsteht (Abb. 36).

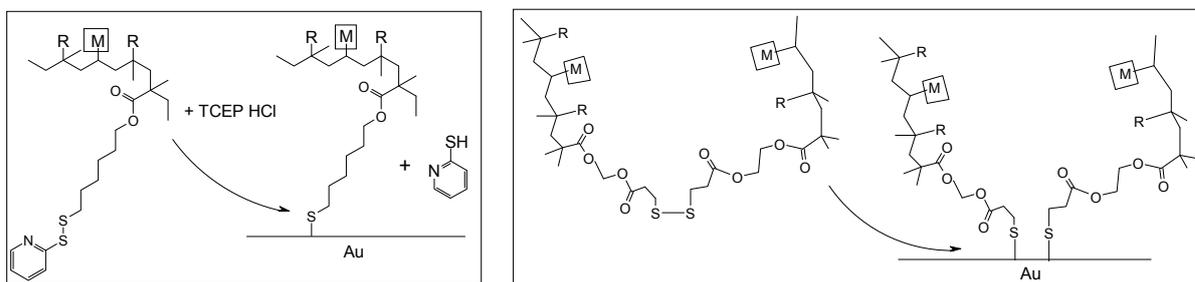


**Abb. 36** Synthese von PEGMA-Fc-SH (**15**) und PEGMA-Fc-SS (**16**);  $x$ : 25;  $y$ : 25;  $z$ : 10;  $a$ : 10;  $b$ : 10;  $n$ : 3

Die mittels GPC ermittelten apparenten Molekulargewichte ergaben vergleichsweise kleine Werte von 4 (**15**) bzw. 8 kD. (**16**). Es ist mehrfach beobachtet worden, dass die Copolymerisation von Ferrocen und Methacrylaten zu kurzen Polymerketten führt.<sup>[184]</sup> **16** war doppelt so groß wie **15**, die Polydispersitäten von 1.7 bzw. 1.4 wiesen auf eine gleichmäßige Struktur der Polymerketten hin.

Die Absorptionsmaxima von 450 nm zeigten eine bathochrome Verschiebung um ca. 20 nm im Vergleich zum Monomer (430 nm). Damit bieten die Spektren einen Beleg für den integrierten Mediator.

Die Ankopplung der Polymere erfolgte jeweils in einem Schritt direkt auf der Goldelektrode (Abb. 37).



**Abb. 37** Schema der Ankopplung von PEGMA-Fc-SH und PEGMA-Fc-SS an Goldelektroden

Die elektrochemische Charakterisierung ergab ein Redoxpotential von + 400 mV für beide Polymere mit einer Peakseparation von  $\sim 20$  mV für quasi-reversible Redoxprozesse, vergleichbar mit Fc-modifizierten Siloxanpolymeren.<sup>[185]</sup> Die Oberflächenbelegungen für **15** und **16** betragen  $1.5 \cdot 10^{-11}$  mol cm<sup>-2</sup>. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für den heterogenen ET ( $k_s$ ) betragen 70 bzw 50 s<sup>-1</sup> und waren damit eineinhalb- bis zweifach größer als für eine homogene SAM aus 9-Mercaptononyl-5'-ferrocenylpentanoat zehnfachen  $\Gamma$  ( $4.2 \cdot 10^{-10}$  mol cm<sup>-2</sup>).<sup>[118]</sup>

Die zehnfache Erhöhung des eingesetzten Mediatoranteils in den PEGMA-Polymeren im Vergleich zum PNIPAMFoxy führten weder zu einem höherem  $\Gamma$  noch zu einer höheren  $k_s$ . Der Grund liegt möglicherweise darin, dass die längeren PEG-Ketten den effektiven, heterogenen ET innerhalb des Polymers behindern.

Die Ankopplung von PEGMA-Fc-SH und PEGMA-Fc-SS an eine Goldoberfläche wurde in einer Kontaktwinkelmessung bestätigt. Kontaktwinkel von 67 bzw. 74° sprechen für hydrophilere Oberflächen und unterscheiden sich, wenn auch nur gering, von unmodifiziertem Gold (70°).<sup>[182]</sup>

Die Ankopplung der Schwefel-modifizierten Polymere wurde weiterhin über eine Scanratenabhängigkeit des Peakstroms untersucht. Die lineare Abhängigkeit des Peakstroms von der Scanrate bestätigte für beide Polymere eine Diffusionsunabhängigkeit und damit die Oberflächenmodifizierung.

Die Lagerungsstabilität der PEGMA-Fc-modifizierten Elektroden in Form von Peakstrom und -potential über 20 Tage zeigte ähnliche Kurvenverläufe wie die PNIPAMFoxy-modifizierter Elektroden. Das Stromsignal sank um ca. 33 % und das Peakpotential um ca. 5 % innerhalb der ersten 8 Tage für beide polymermodifizierten Elektroden. Nach dem achten Tag waren relativ konstante Werte zu verzeichnen.

Für PEGMA-Fc-SS wurde eine LCST von 16°C bestimmt, für PEGMA-Fc-SH konnte keine LCST eindeutig bestimmt werden. Die Ergebnisse wiesen auf eine LCST unter 20°C hin. Die

Polymere sind durch die verwendeten OEGMA und trotz der kleinen Molekulargewichte relativ hydrophob und binden wenig Wasser. Beide LCST für die PEGMA-Fc-Polymere liegen unterhalb der RT. Die Polymere liegen bei RT in dehydratisiertem, geschrumpftem Zustand vor. Die zusätzlichen Monomere, Ferrocen und Disulfid- bzw. Thioleinheit, verstärken die Hydrophobizität und senken die Wasserlöslichkeit. Homopolymere aus MEO<sub>2</sub>-MA zeigen eine LCST von 28°C, Copolymere aus Triethylenglykol- (MEO<sub>3</sub>-MA) und 15 % Diethylenglykolmethacrylaten (MEO<sub>2</sub>-MA) zeigen eine LCST von 30°C.<sup>[79, 82]</sup>

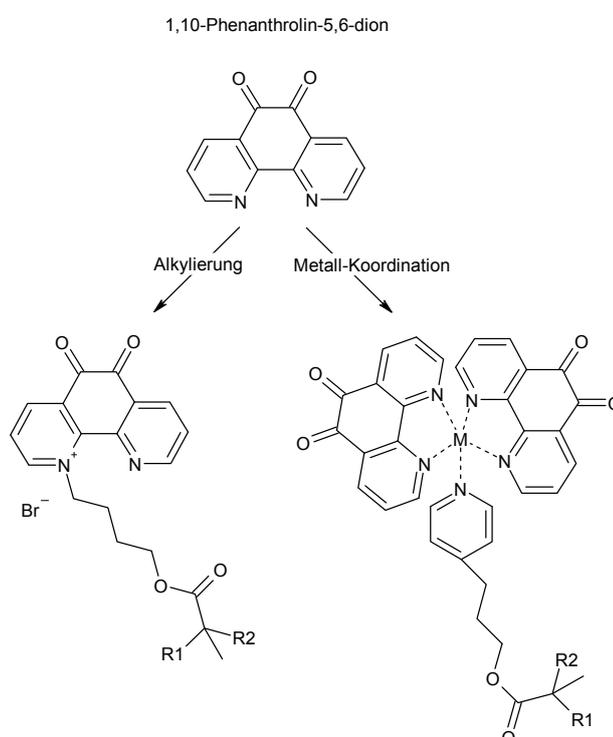
Der pH-Wert für PEGMA-Fc-SS-modifizierte Elektroden änderte sich im pH-Bereich von 5 bis 8 um – 8 mV/pH. Vergleichbar mit den Ergebnissen für PNIPAMFoxy, zeigte auch dieses Ferrocenpolymer, wie erwartet, eine geringe Ansprechbarkeit auf Protonen. Für **15** wurde die pH-Untersuchung nicht durchgeführt.

### 3.1.3.3 Zusammenfassung

Es wurden PNIPAM- und PEG-basierte, hydrophile Ferrocen-Polymere mit Molekulargewichten von 36 bzw. 4 und 8 kD synthetisiert. Die Copolymerisation des Mediators wurde mittels Absorptionsspektrometrie und Elektrochemie gezeigt. Die Ankopplung der Polymere zur Ausbildung dünner Polymerfilme an den Elektroden erfolgte über Epoxy-, Thiol- bzw. Disulfidgruppen und wurde elektrochemisch und mit Kontaktwinkelmessungen bestätigt. Die Halbstufenpotentiale betragen + 370 und + 400 mV (Ag|AgCl). Wie bei Fc-SAM führen die hohen Mediatormengen zu höheren Redoxpotentialen.<sup>[27, 117, 118]</sup> Die Redoxpotentialen sind vergleichbar mit denen von Ferrocen-modifizierten PNIPAM- bzw. Siloxanpolymeren.<sup>[125, 185]</sup> Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für den heterogenen Elektronentransfer für die drei Polymere mit Oberflächenbelegungen von 10<sup>-11</sup> mol cm<sup>-2</sup> betragen 80 (PNIPAMFoxy (**12**)), 70 (PEGMA-Fc-SH (**15**)) und 50 s<sup>-1</sup> (PEGMA-Fc-SS (**16**)). Die  $k_s$  für die selbstassemblierten, dreidimensionalen Polymermonoschichten sind dennoch größer als für eine quasi-zweidimensionale, homogene Monoschicht aus 9-Mercaptononyl-5'-ferrocenylpentanoat ( $\Gamma$  4.2·10<sup>-10</sup> mol cm<sup>-2</sup>).<sup>[118]</sup> Eine Erhöhung der Oberflächenbelegung und der  $k_s$  durch die höhere eingesetzte Mediatormenge bei der PEGMA-Polymersynthese konnte nicht beobachtet werden. Alle Polymere zeigten eine Lagerstabilität bei trockenen Bedingungen über mehrere Wochen, wobei konstante Potential- und Stromwerte ab dem sechsten (**12**) bzw. achten Tag (**15/16**) auftraten. PNIPAMFoxy zeigte eine Erniedrigung der LCST von 32 auf 30°C durch die Einführung der Epoxygruppe.<sup>[176, 183]</sup> Die PEGMA-Fc-Polymere zeigten eine LCST unterhalb der Raumtemperatur. Die Anteile von 14.5 % des hydrophoben Fc und der Thiol- bzw. Disulfidgruppen erniedrigten die LCST gegenüber vergleichbaren PEGMA-Copolymeren.<sup>[79, 82]</sup> Alle drei Polymere zeigten eine geringe Empfindlichkeit des Peakpotentials auf pH-Wert-Änderungen. Das Potential nahm um ca. 8 mV/pH ab.

### 3.1.4 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion-Polymere

1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (PD) gehört zur Substanzklasse der *ortho*-Chinone. Chinone können zu Dihydrochinonen reduziert und wieder oxidiert werden. PD wurde mehrfach als Mediator für die Oxidation von NADH beschrieben. Dabei wurde er in Metallkomplexen oder als alkylierte Substanz untersucht.<sup>[28, 100, 127, 186]</sup> Daraus ergaben sich zwei Synthesestrategien analog zur Literatur<sup>[127, 139]</sup> für diese Arbeit: 1.) die Alkylierung des PD zur Einführung einer polymerisierbaren Gruppe und anschließende Copolymerisation und 2.) die Einführung des Mediators in das Polymer über eine Metall-Koordination (Abb. 38).

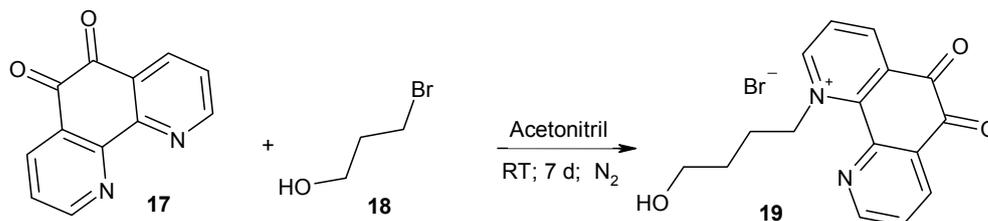


**Abb. 38** Strategien für die Integration des 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion in das Redoxpolymer (R1, R2)

#### 3.1.4.1 Alkylierung von 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion

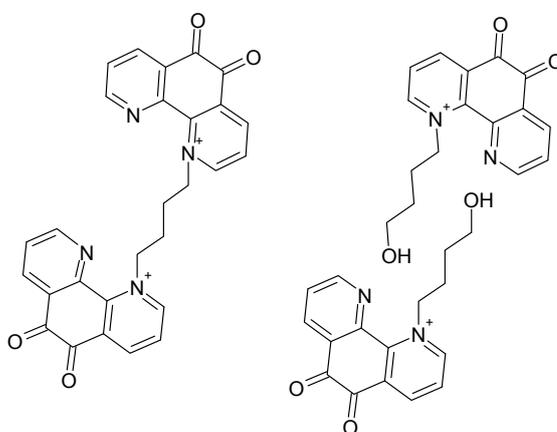
Der Versuch zur Alkylierung von PD (**17**) erfolgte analog zur Literatur.<sup>[127]</sup> Als Alkylierungssubstanz wurde Brombutanol (**18**) gewählt. Es sollte eine nucleophile Substitution des Broms durch den Stickstoff des PD unter Bromidabspaltung ablaufen. Die endständige OH-Gruppe des Brombutanols sollte im Anschluss mit Methacrylsäurechlorid zu polymerisierbaren Derivaten umgesetzt werden. Die Reaktion von PD mit Brombutanol wurde nach 7 Tagen bei Raumtemperatur gestoppt. Das intensivgelbe Reaktionsprodukt

wurde mittels HPLC aufgereinigt und ergab zwei Fraktionen, welche mit  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR und Massenspektrometrie charakterisiert wurden.



**Abb. 39** Synthese von 1-(4-Hydroxybutyl)-1,2-dihydro-1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (**19**)

Eine eindeutige Zuordnung der Fraktionen zu bestimmten Strukturen war nicht möglich. Trotz der Aufreinigung mittels HPLC wurden anscheinend weitere Molekülgemische, statt reiner Molekülfractionen gewonnen. Die NMR-Spektren der HPLC-Fractionen ließen keine Zuordnung aller Peaks zu den H- oder C-Atomen zu. Beide Fraktionen ergaben ähnliche Peaks, jedoch fehlten jeweils auch welche. Die erhaltenen Massenpeaks deuteten auf das Vorliegen von PD-Butanol, als auch auf kovalente und ionische Dimere dieser (Abb. 40). Es ließ sich nicht eindeutig herausstellen, ob es sich tatsächlich um Dimere handelte und ob diese Dimere durch kovalente Bindungen oder durch ionische Wechselwirkungen der OH-Gruppe des einen PD-Butanols mit dem Stickstoff eines zweiten PD-Butanols herrührten.



**Abb. 40** Mögliche kovalente und ionische Dimerbildung alkylierter 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion

Eine Röntgenkristallstrukturanalyse der entstandenen Kristalle ergab die Struktur von protoniertem PD – 1,10-Phenanthrolin-5,6-diol - und zeigte überhaupt keine Alkylierung. In einem Kontrollexperiment mit Brombutan sollte die Dimerbildung über die Hydroxidgruppen, durch Fehlen dieser, verhindert werden. Die Charakterisierung der Reaktion von Brombutan mit PD mittels HPLC ergab nur den PD-Peak. Es ist kein weiteres Produkt entstanden.

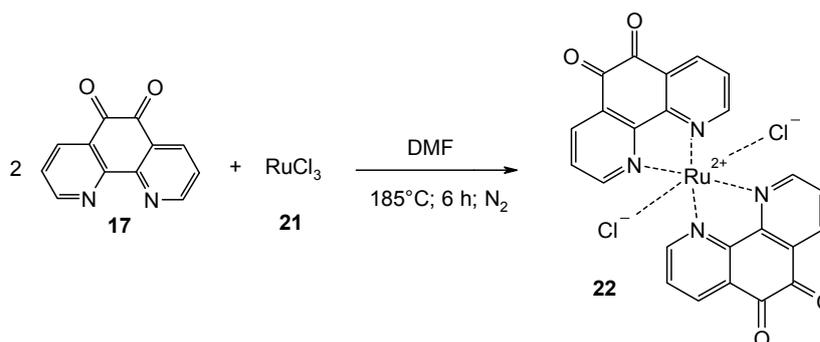
Parallel zu den Alkylierungsexperimenten wurde an der Metallkoordinationsstrategie gearbeitet. Diese Experimente zeigten eine erfolgreiche Integration des PD in das PNIPAM-Polymer. Aus diesem Grund wurde die weitere Bearbeitung der Alkylierungsstrategie eingestellt und der Fokus auf die Metallkoordination gelegt.

### 3.1.4.2 Metall-Koordination des 1,10-Phenanthrolin-5,6-dions

Die Metallkoordination des PD wird sowohl über Osmium-<sup>[131, 132, 135]</sup> als auch Rutheniumionen,<sup>[127, 136, 187]</sup> seltener durch Eisen-, Cobalt- oder Kupferionen<sup>[188]</sup> durchgeführt. In dieser Arbeit sollte die Komplexbildung über Rutheniumionen erfolgen. Ruthenium bildet stabilere Komplexe als Osmium und die Redoxpotentiale von Ru-Komplexen sind größer.<sup>[188]</sup> Allerdings wird darauf hingewiesen, dass hier der Ligand als Mediator fungieren soll, nicht das Metall, wie in vielen anderen Metall-Komplexen mit Bipyridinen.<sup>[98, 99, 104]</sup> Unter neutralen und basischen Bedingungen wird PD nur bis zum Semichinon reduziert. Daher wurde ein Metallkomplex mit zwei PD-Molekülen synthetisiert, womit ein 2e-2H-Transfer gewährleistet wird.

### 3.1.4.3 Synthese von $[Ru(PD)_2]^{2+}$ -Komplex (22)

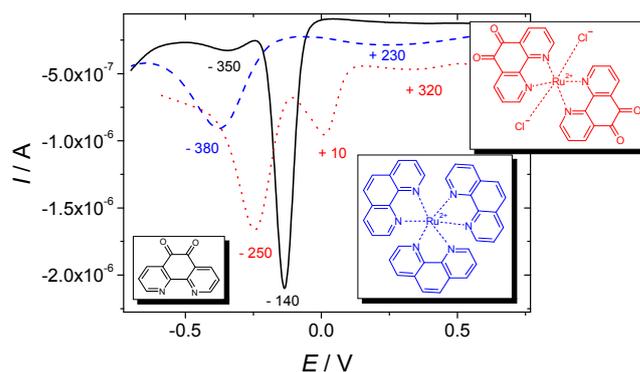
Der Metallkomplex aus 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (17) und Rutheniumchlorid (21) wurde analog zur Literatur,<sup>[127, 139]</sup> wie unter Abb. 41 dargestellt, synthetisiert. Das rotbraune, feste Produkt wurde analog zur Literatur mit einer Ausbeute von 58 % isoliert und massenspektrometrisch bestätigt.<sup>[139]</sup>



**Abb. 41** Synthese von  $[Ru(PD)_2]^{2+}$ -Komplex (22)

Der Komplex zeigte im Square-Wave-Voltammogramm (SWV) drei Peaks mit Potentialen von -250, +10 und +320 mV an einer Goldelektrode (Abb. 42  $\cdots$ ). Die Potentiale lassen sich, im Vergleich mit den SWV von Ruthenium-Triphenanthrolin-Komplex  $[RuP_3]$  (Abb. 42  $--$ ) und 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (Abb. 42  $—$ ), Ruthenium (Ru) und PD zuordnen. Der kommerziell erhältliche  $[RuP_3]$ -Komplex wurde als Vergleichsubstanz gewählt, da er dem

synthetisierten Komplex sehr ähnlich ist. Das Phenanthrolin hat im Vergleich zu PD keine Ketogruppen, zeigte daher keine Redox Eigenschaften im untersuchten Bereich. Die erhaltenen Redoxpeaks für  $[\text{RuP}_3]$  waren daher dem Ruthenium zuzuordnen. Die Peakpotentiale für Ruthenium im  $[\text{RuP}_3]$  betragen  $-380$  und  $+230$  mV, für PD wurden Peakpotentiale von  $-350$  und  $-140$  mV erhalten. Die Peakpotentiale von  $-350$  bzw.  $-380$  mV von PD und  $[\text{RuP}_3]$  interferierten miteinander. Das negative Peakpotential von  $[\text{Ru}(\text{PD})_2]^{2+}$  bei  $-250$  mV konnte damit nicht eindeutig dem PD oder dem Ru zugeordnet werden. Der Peak bei  $+10$  mV des neuen Komplexes kann dem PD zugeordnet werden, durch eine Verschiebung des Peakpotentials von PD bei  $-140$  mV. Der Peak bei  $+230$  mV ließ sich im neuen Komplex durch Vergleich mit dem SWV für  $[\text{RuP}_3]$  eindeutig dem  $\text{Ru}^{2+/3+}$  zuordnen. Wie durch die Überlagerung der drei Graphen deutlich wird, verschieben sich die Redoxpotentiale der einzelnen Anteile im neuen Komplex um ca.  $100$  mV zu positiveren Potentialen.

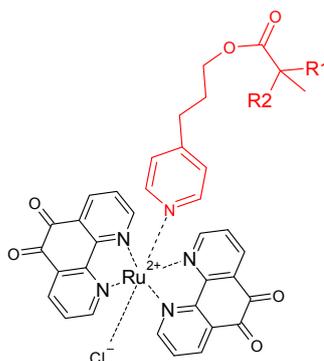


**Abb. 42** Square-Wave-Voltammogramme von Phenanthrolindion (PD —), Ruthenium-Phenanthrolin- ( $[\text{RuP}_3]$  - - -) in HBS pH 7.5/10% DMSO und Ruthenium-Phenanthrolindion-Komplex ( $[\text{Ru}(\text{PD})_2]^{2+}$  - - -) in HBS pH 7.5; RE: Ag|AgCl, GE: Platin

Im Vergleich zu dem Redoxpotential eines  $[\text{Ru}(\text{PD})_3](\text{ClO}_4)_2$ -Komplexes ( $-55$  mV vs. Ag|AgCl bei pH 8) gemessen an einer Glaskohlenstoff-Elektrode (GCE) zeigte der  $[\text{Ru}(\text{PD})_2]^{2+}$ -Komplex aus dieser Arbeit mit  $+10$  mV einen ähnlichen Wert.<sup>[127, 187]</sup> Das Potential für einen  $[\text{Ru}(\text{PD})_3](\text{PF}_6)_2$ -Komplex an einer GCE von  $-126$  mV vs. Ag|AgCl bei pH 9.3, ähnelt mehr dem des unkoordinierten PD an Goldelektroden.<sup>[187]</sup> Allgemein kann das Redoxverhalten an GCE von dem an Goldelektroden abweichen. Ein  $[\text{Ru}(\text{PD})_3]^{2+}$ -Komplex an Platin oder pyrolitischen Graphitelektroden zeigt in Acetonitril drei Redoxpeaks bei  $+1.4$  V für  $\text{Ru}^{2+/3+}$ ,  $-0.13$  und  $-0.86$  V für das PD (vs SSCE).<sup>[188]</sup> Diese Werte liegen deutlich außerhalb des Potentialbereichs in wässrigen Lösungsmitteln, dennoch zeigen sie eine ähnliche, weiter auseinander gespreizte Verteilung der einzelnen Potentiale. Der Unterschied

in den Potentialen zwischen dem in dieser Arbeit hergestellten  $[\text{Ru}(\text{PD})_2]^{2+}$ -Komplex und der Literatur-bekanntem Komplexen kann dem Elektrodenmaterial und dem Lösungsmittel zugeordnet werden.

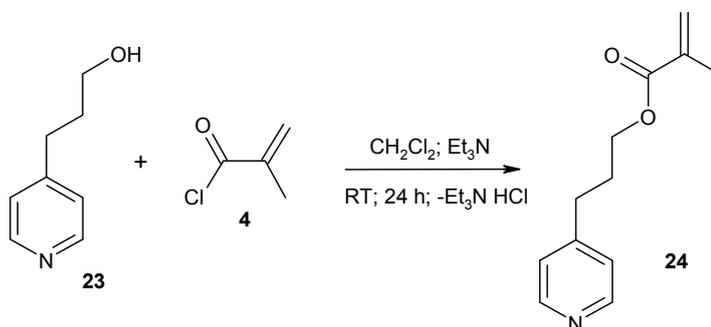
Analog zu anderen Metallkomplexen in Redoxpolymeren wurde der Rutheniumkomplex über einen stickstoffhaltigen Liganden (Imidazol-, Pyrrol- oder Pyridinring) in das Polymer integriert (Abb. 43).<sup>[98, 99, 101, 113, 137]</sup>



**Abb. 43** Schema der Integration des  $[\text{Ru}(\text{PD})_2]^{2+}$ -Komplexes (schwarz) über einen Pyridinliganden (rot) in die Polymere. R1 und R2 deuten das Polymergerüst an.

#### 3.1.4.4 3-(Pyridin-4-yl)propylmethacrylat (24)

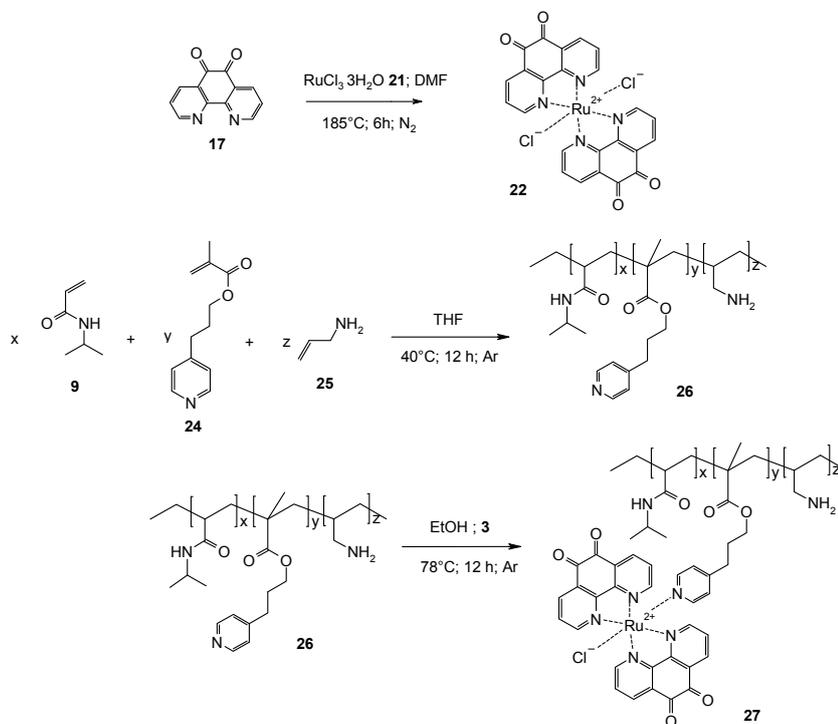
Der Ligand zur Komplexierung des  $[\text{Ru}(\text{PD})_2]^{2+}$  wurde aus 4-Pyridinpropanol (**23**) und Methacrylsäurechlorid (**4**) (Abb. 44) mit einer Ausbeute von 20 % synthetisiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte über Dünnschichtchromatographie. Die Struktur wurde mittels  $^1\text{H-NMR}$  und Massenspektrometrie bestätigt. Der Ligand wurde vor jeder Polymersynthese frisch säulenchromatographisch (Kieselgel 60,  $\text{CHCl}_3$ ) aufgereinigt.



**Abb. 44** Syntheseweg für 3-(Pyridin-4-yl)propylmethacrylat **24**

### 3.1.4.5 PNIPAM-RuPD-NH<sub>2</sub> (**27**)

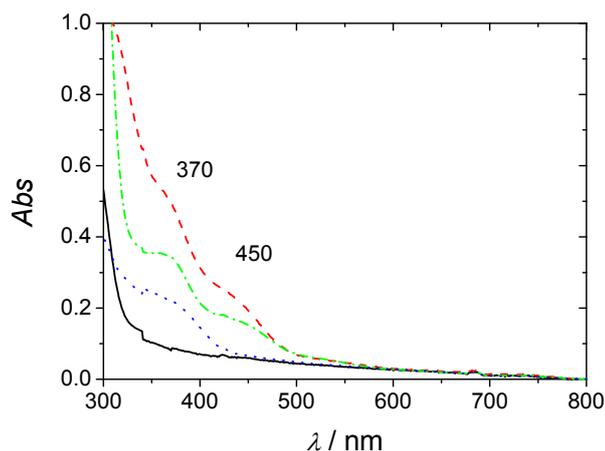
NIPAM (**9**), **24** und Allylamin (**25**) wurden copolymerisiert. Das weiße, feine Pulver **26** wurde mit einer Ausbeute von 72 % gewonnen. Nach dem Umsatz von **26** mit dem [Ru(PD)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>-Komplex wurde eine rotbraune, harzähnliche Substanz mit einer Ausbeute von 60 % isoliert (Abb. 45).



**Abb. 45** Synthesewege für PNIPAM-RuPD-NH<sub>2</sub> **27**; x: 55; y:1; z: 15

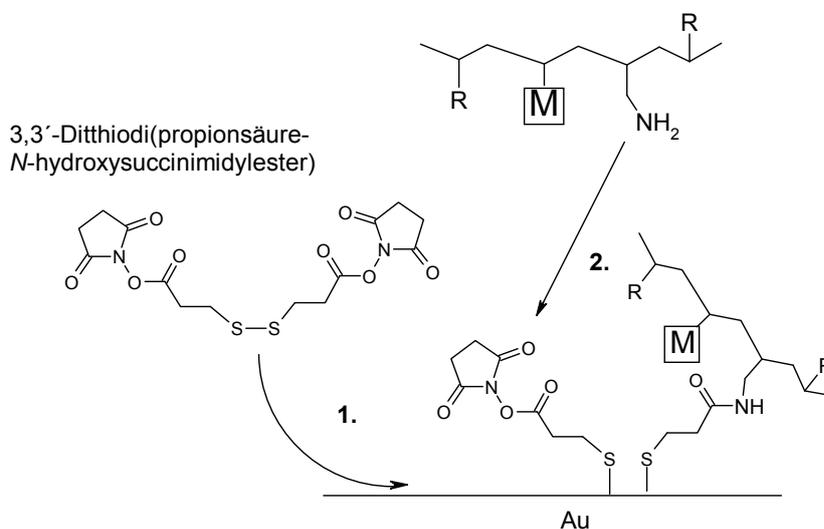
Das apparente Molekulargewicht für **27** ergab 13 kD. Es wies eine Polydispersität von 1.7 auf, was auf eine relativ einheitliche Verteilung der Polymerketten deutet. Diese Werte stimmen mit vergleichbaren PNIPAM-Polymeren überein.<sup>[175]</sup>

Die Absorptionsspektren für **27** stimmten mit dem des Mediators überein (PD: 370 nm; RuPD: 370, 450 nm), ebenso sind sie vergleichbar mit der Literatur.<sup>[188]</sup> Das mediatorlose Vergleichspolymer zeigte keine Absorptionsmaxima bei den entsprechenden Wellenlängen (Abb. 46). Die Modifizierung des Polymers mit dem Metallkomplex war erfolgreich.



**Abb. 46** Absorptionsspektren für PNIPAM-RuPD-NH<sub>2</sub> (---); [Ru(PD)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (---); PD (---) und das mediatorlose Vergleichspolymer **26** (—) in Ethanol

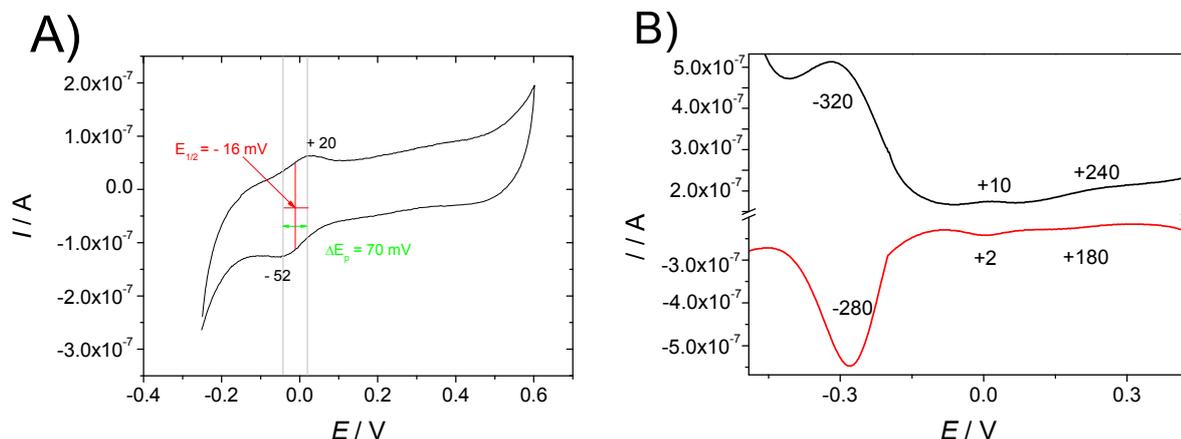
Die Elektrodenmodifizierung von Goldelektroden mit **27** muss über einen externen Thiollinker erfolgen. Dazu wurde 3,3'-Dithiodi(propionsäure-*N*-hydroxysuccinimidylester) (DTP-NHS) verwendet, welches selbstassemblierte Monoschichten auf Goldoberflächen bildet. Die Aminogruppe des Polymers reagiert mit dem NHS-Ester unter Bildung einer Amidbindung (Abb. 47).



**Abb. 47** Oberflächenmodifizierung mit 3,3'-Dithiodi(propionsäure-*N*-hydroxy-succinimidylester) und PNIPAM-RuPD-NH<sub>2</sub>

PNIPAM-RuPD-NH<sub>2</sub> zeigte im CV im Bereich von -250 bis +600 mV ein Peakpaar mit einem Halbstufenpotential von -16 mV, entsprechend dem PD im [Ru(PD)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>-Komplex. Der Rutheniumpeak im positiven Potentialbereich ist gering ausgeprägt (Abb. 48). Das SWV zeigte drei Peakpotentiale, korrelierend mit denen von [Ru(PD)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, bei -320, +10 und

+ 240 mV (Vgl. Abb. 42). Die Oberflächenbelegung beträgt, ähnlich wie bei PNIPAMFoxy,  $1.3 \cdot 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ . Die ermittelte  $k_s$  betrug  $20 \text{ s}^{-1}$ , vergleichbar mit der  $k_s$  für einen adsorbierten Os-PD-Komplex mit ca. zehnfach höherer Oberflächenbelegung ( $\Gamma 2.5 \cdot 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ ).<sup>[135]</sup> Damit zeigte das angekoppelte Polymer bei zehnfach kleinerer  $\Gamma$  einen genauso guten ET wie die adsorbierte Schicht eines vergleichbaren Mediators.

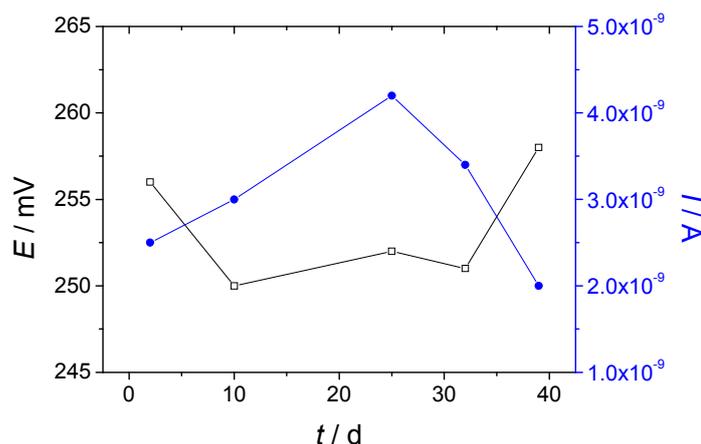


**Abb. 48** Cyclisches Voltammogramm (A) und Square-Wave-Voltammogramm (B) für PNIPAM-RuPD-NH<sub>2</sub>-modifizierte Goldelektroden in HBS pH 7.5, RE: Ag|AgCl, GE: Platin

Die Modifizierung der Elektrodenoberflächen wurde mittels Abhängigkeit des Peakstroms von der Scanrate untersucht. Die lineare Abhängigkeit des Stromes von der SR zeigt eine Diffusionsunabhängigkeit und damit die Oberflächenmodifizierung.

Die Elektrodenmodifizierung wurde außerdem über eine Kontaktwinkelmessung verifiziert. Der gemessene Kontaktwinkel von 62° wich vom Kontaktwinkel für unmodifiziertes Gold (70°) um 8° ab, daher kann von einer hydrophilen Modifizierung der Oberfläche ausgegangen werden.

Die modifizierten Elektroden zeigten eine Langzeitstabilität über 40 Tage. Der Peakstrom und das Peakpotential variierten um 25 % bzw. 1.5 % in dieser Zeit.

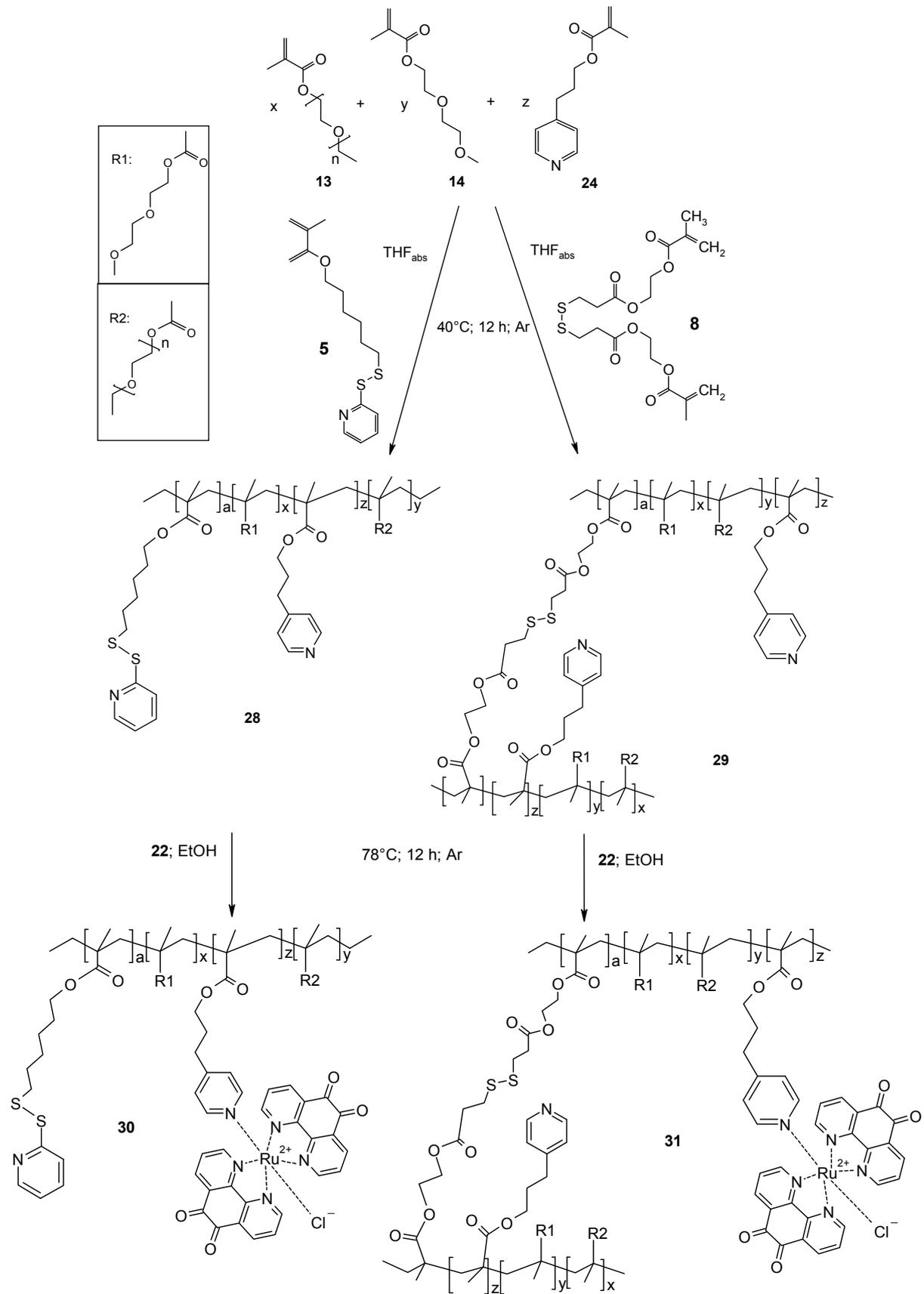


**Abb. 49** Stabilität der PNIPAM-RuPD-NH<sub>2</sub>-modifizierten Goldelektroden in HBS pH 7.5, SR 20 mV s<sup>-1</sup>, RE: Ag|AgCl, GE: Platin; Peakstrom (-■-), Peakpotential (-□-)

Dieses Polymer ist sehr gut wasserlöslich und wie erwartet thermoresponsiv. Die LCST von 47°C wurde in wässriger Lösung turbidimetrisch ermittelt. Damit führte das Einführen des geladenen Mediatorkomplexes und des Allylamins zu einer Erhöhung der LCST um 15°C gegenüber reinem PNIPAM.<sup>[176, 183]</sup>

#### 3.1.4.6 PEGMA-RuPD-SH (30) und PEGMA-RuPD-SS (31)

Triethylenglykolmonoethylethermethacrylat (**13**), Diethylenglykolmethylethermethacrylat (**14**) und 3-(Pyridin-4-yl)propylmethacrylat (**24**) wurden mit 6-(Pyridin-2-yl)disulfanyl)hexylmethacrylat (**5**) bzw. Dithio-((dipropanoxyloxy)ethylmethacrylat) (**8**) copolymerisiert. Die Ausbeuten für die mediatorlosen Polymere betragen 76% bzw. 50%. Anschließend wurden die Polymere mit dem Ruthenium-1,10-Phenanthrolin-5,6-dion-Komplex (**22**) umgesetzt. Das Ergebnis waren zwei rotbraune, feste Gele: Das PEGMA-RuPD-SH (**30**) ist ein lineares Polymer, während das PEGMA-RuPD-SS (**31**) ein durch intramolekulare Disulfidgruppen quervernetztes Polymer ist (Abb. 50).



**Abb. 50** Synthese von PEGMA-RuPD-SH **30** und PEGMA-RuPD-SS **31**;  $x: 25; y: 25; z: 10; a: 10$

Die apparenten Molekulargewichte der beiden Polymere betragen 25 (**30**) und 30 kD (**31**). Die Polydispersität von 1.7 für **30** zeigte eine gleichmäßige Strukturverteilung der Polymerketten. Eine Polydispersität von 4.3 für das quervernetzte Polymer wies auf Unregelmäßigkeiten in der Struktur hin. Die Quervernetzung kann zu einem unregelmäßigen Laufverhalten des Polymers in der Gelpermeationschromatographie führen. Es kann sich aber auch um eine Mischung aus Polymerketten verschiedener Länge und Zusammensetzung handeln.

Die Absorptionsspektren der Polymere (370, 450 nm) und des Mediators stimmten überein (PD: 370 nm; RuPD: 370, 450 nm). Ebenso korrelierten sie mit der Literatur.<sup>[188]</sup> Das mediatorlose Vergleichspolymer zeigte keine Absorption im untersuchten Wellenlängenbereich. Die Absorptionseigenschaften der Polymere belegten das Vorhandensein des Mediators im Polymer.

Die Peakpotentiale von - 200 mV/+ 230 mV und -300 mV/+ 340 mV (Ag|AgCl) für PEGMA-RuPD-SH- bzw. PEGMA-RuPD-SS-modifizierte Goldelektroden wurden mittels Square wave Voltammetrie (SWV) bestimmt. Um die Potentiale den entsprechenden ET zuzuordnen zu können, wurden wie bereits beschrieben (Kap. 3.1.4.3.) Vergleichsexperimente mit PD,  $[\text{RuP}_3]$  und  $[\text{Ru}(\text{PD})_2]^{2+}$  durchgeführt. Die Peakpotentiale von - 350 bzw. - 380 mV von PD und  $[\text{RuP}_3]\text{Cl}_2$  interferierten miteinander. Das negative Peakpotential der Polymere bei - 200 mV bzw. - 300 mV konnte damit nicht eindeutig dem PD oder dem Ru zugeordnet werden. Der Peak bei + 10 mV des Rutheniumkomplexes trat in beiden Polymeren nicht auf. Die positiven Peakpotentiale bei + 230 mV und + 340 mV lassen sich durch die Vergleichsexperimente deutlich dem  $\text{Ru}^{2+/3+}$ -Übergang zuordnen. Der heterogene ET vom Ru zur Elektrode ist effizienter und führt zu höheren Peakströmen als für das PD. Die hohen Rutheniumpeaks überdecken möglicherweise den PD-Peak. Die Oberflächenbelegungen betragen, ähnlich zu den anderen Polymeren,  $2 \cdot 10^{-11}$  (**30**) bzw.  $4 \cdot 10^{-11}$  mol  $\text{cm}^{-2}$  (**31**).

Eine Scanratenabhängigkeit des Peakstroms für beide Polymere ergab eine lineare Abhängigkeit. Damit wurde die Oberflächenmodifizierung mit den neuen PEGMA-RuPD-Polymeren bestätigt.

Die Ankopplung an Goldelektroden erfolgte direkt über die internen Thiol- bzw. Disulfidgruppen (siehe PEGMA-Fc-Polymere Abb. 37). Durch eine Kontaktwinkelbestimmung konnte die Modifizierung bestätigt werden. Der Kontaktwinkel von unmodifiziertem Gold ( $70^\circ$ ) wurde auf  $48^\circ$  bzw.  $61^\circ$  erniedrigt. Diese Polymere bildeten damit hydrophilere Oberflächen aus als Gold.<sup>[182]</sup>

Die LCST der beiden Polymere betragen 30 und  $31^\circ\text{C}$ . Sie waren vergleichbar mit dem PNIPAM-Polymer und lagen oberhalb der Raumtemperatur. Das bedeutet, dass die Polymere bei RT hydratisiert vorliegen. Die Copolymerisation mit den hydrophoben Thiol- und Disulfidlinkern senkt die LCST, der hydrophile RuPD-Komplex kann das nicht

ausgleichen. Diese LCST ist dennoch deutlich größer als für die PEGMA-Fc-Polymere gleicher Zusammensetzung. Die zur Polymerisation verwendeten OEGMA-, Disulfid- und Thiolmonomere entsprechen denen, der Fc-Polymere, jedoch trug der im Vergleich zum Fc deutlich hydrophilere RuPD-Komplex zur Erhöhung der LCST bei.

Die LCST eines Copolymers aus denselben Monomeren mit den gleichen Anteilen zeigt eine LCST von 40°C,<sup>[82]</sup> ein Copolymer aus OEGMA-MEO<sub>2</sub>-MA-Copolymere (5:95) zeigt den Phasenübergang bei 32°C.<sup>[79]</sup>

PD ist ein Elektronen- gekoppelt an Protonen übertragender Mediator, daher wurde eine Abnahme des Potentials mit zunehmendem pH-Wert erwartet. Beide Polymere zeigten im pH-Bereich von 6 bis 9 eine starke Abnahme des Peakpotentials um – 77 (**30**) bzw. – 53 mV/pH (**31**). Das entspricht annähernd dem Nernst-Verhalten von – 58 mV/pH. Im pH-Bereich von 2 bis 6 blieb das Peakpotential konstant. Dieses widerspricht den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen. Dort wurde ein Abfall des Peakpotentials über den gesamten pH-Bereich für einen gelösten [Ru(PD)<sub>3</sub>](ClO<sub>4</sub>)-Komplex beobachtet.<sup>[127]</sup> Wahrscheinlich werden die überschüssigen Protonen in dem pH-Bereich (2-6) durch die hydratisierte Polymermatrix neutralisiert.

Die PEGMA-RuPD-Polymer-modifizierten Goldelektroden zeigten keine Elektrooxidation für NADH bzw. PQQH<sub>2</sub> (siehe Kap. 3.2.2.4.) und daher wurde auf die Bestimmung weiterer Parameter verzichtet. Die Verwendung anderer Elektrodenmaterialien für diese Polymere, z.B. die Immobilisierung auf GCE über silanisierte, funktionelle Oberflächen oder in CPE, könnte die Oxidation der Coenzyme ermöglichen.

### 3.1.4.7 Zusammenfassung

PNIPAM- und PEGMA-basierte, hydrophile 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion-basierte Polymere mit Molekulargewichten von 13 bzw. 25 und 30 kD wurden synthetisiert. Der Mediator wurde über eine Metall-Koordinierung in das Polymer integriert, wie mittels UV/Vis-Spektrometrie bestätigt wurde. Die Ankopplung der Polymere auf Goldoberflächen über interne und externe Schwefelgruppen wurde elektrochemisch und mit Kontaktwinkelmessungen bestätigt. Die Peakpotentiale lagen zwischen – 300 und + 340 mV (Ag|AgCl). Die negativen Peakpotentiale der Polymere lassen sich nicht eindeutig dem Ruthenium oder dem 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion zuordnen. Der Redoxpeak des PNIPAM-RuPD-NH<sub>2</sub> bei + 10 mV im SWV ist eindeutig dem PD zuzuordnen.<sup>[127, 187]</sup> Der Unterschied im Redoxverhalten des PNIPAM- und der PEGMA-Polymere lässt sich auf die unterschiedliche Menge an Mediator zurückführen. Eine geringere Menge an Redoxmediator (1.5 %) ergab die gewünschten Redoxpeaks, während bei einem Anteil von 14.5 % kein Redoxpeak des Liganden (PD) mehr zu verzeichnen war. Die PEGMA-RuPD-Polymere zeigten unerwünscht hohe Redoxpeaks des Zentralatoms Ruthenium. Die Geschwindigkeitskonstante für den heterogenen Elektronentransfer vom PD

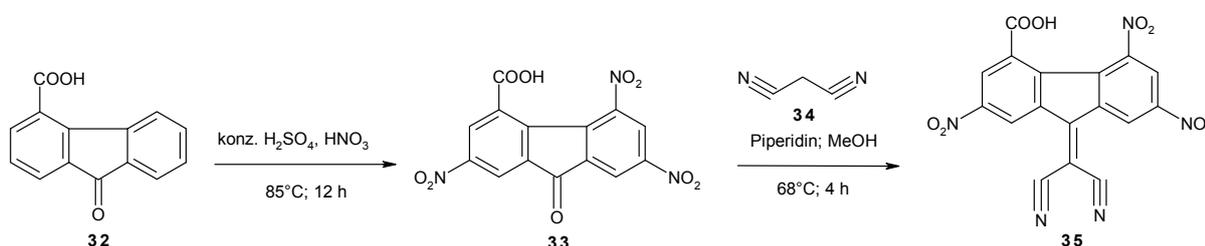
zur Elektrode für PNIPAM-RuPD-NH<sub>2</sub> betrug 20 s<sup>-1</sup>. Die PNIPAM-RuPD-modifizierten Elektroden waren mehr als 40 Tage stabil.

Der hydrophile Mediator erhöhte die LCST für das PNIPAM-RuPD-NH<sub>2</sub> im Vergleich zu reinem PNIPAM um ~ 15°C auf 47°C. Die LCST der PEGMA-Polymere betrug wie erwartet ~ 30°C, vergleichbar mit PNIPAM-Polymeren und analog zur Literatur.<sup>[79, 82]</sup> Die PEGMA-RuPD-Polymere liegen bei Raumtemperatur hydratisiert vor. Die pH-Abhängigkeit des Peakstroms verhielt sich für die PEG-Polymere wie erwartet nach Nernst-Verhalten, der Peakstrom nahm um 53 bzw. 77 mV/pH ab.

### 3.1.5 4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenon-Polymere

#### 3.1.5.1 (4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenyliden)malononitril (35)

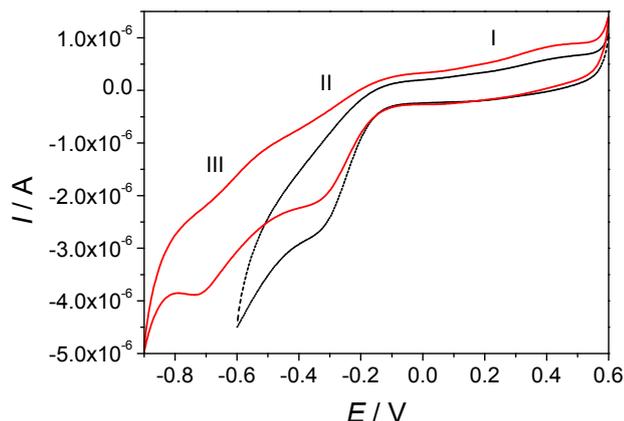
Analog zur Synthese von 2,4,5,7-Tetranitrofluorenon<sup>[189]</sup> und (4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenyliden)malononitril<sup>[148]</sup> (CTFM) wurde der Mediator als Referenzsubstanz synthetisiert. 4-Carboxy-9-fluorenon (**32**) wurde mit einer Lösung aus konz. Schwefelsäure und rauchender Salpetersäure umgesetzt. Aus dem entstandenen 4-Carboxy-2,5,7-trinitrofluorenon (**33**) wurde in einer Knoevenagel-Kondensation mit Malononitril (**34**) (4-Carboxy-2,5,7-trinitro-9-fluorenyliden)malononitril (**35**) erhalten. Die Ausbeute des dunkelblauen Produktes betrug analog zur Literatur 61 % (Abb. 51).<sup>[148]</sup>



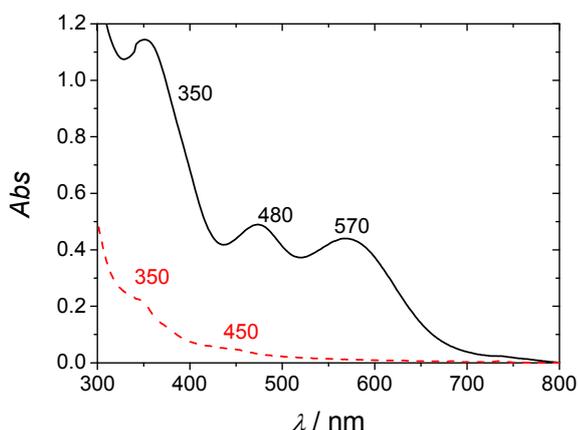
**Abb. 51** Syntheseweg des (4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenyliden)malononitrils **35**

Der Mediator wurde als adsorbierte Monoschicht an einer Goldelektrode untersucht. Die irreversible Reduktion („Aktivierung“) der Nitrogruppen zu Hydroxylamingruppen (siehe 1.3.2.) wurde analog zur Literatur in basischem Puffer pH 8 untersucht (Abb. 52).<sup>[144]</sup> Die experimentellen Beobachtungen wichen von der Literatur ab. Eine NO<sub>2</sub>-Gruppe wird im Bereich von 0 bis + 600 mV aktiviert (Lit.: – 400 bis + 300 mV), zwei NO<sub>2</sub>-Gruppen werden bei Potentialen von – 600 bis + 600 mV (Lit: - 500 bis + 300 mV) und drei NO<sub>2</sub>-Gruppen bei - 900 bis + 600 mV (Lit: - 800 bis + 300 mV) aktiviert. Es wird angenommen, dass sich der Unterschied zur Literatur durch die abweichenden experimentellen Bedingungen ergibt. Die hier verwendeten Bedingungen wurden aufgrund des Enzyms und der Vergleichbarkeit zu weiteren Experimenten in dieser Arbeit gewählt.

Diese Hydroxylamingruppen können anschließend reversibel zu Nitrosogruppen oxidiert werden. Dieses gilt ebenfalls für PEG-CTF-SH (**38**). Die Aktivierung erfolgt im Bereich von - 600 mV bis + 600mV. Dabei werden zwei Nitrogruppen aktiviert,<sup>[144]</sup> welche laut Literatur eine bessere Wechselwirkung des NADH mit dem Mediator in Anwesenheit von Calcium ermöglichen.<sup>[140, 146]</sup>



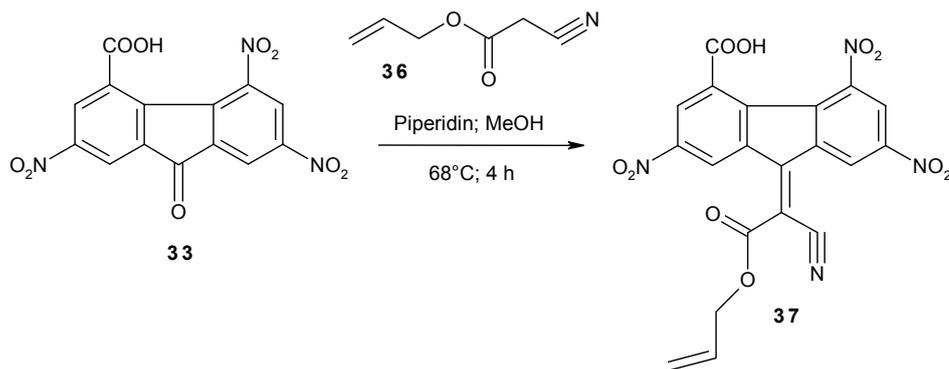
**Abb. 52** Verschiedene Aktivierungspotentiale zur Aktivierung der unterschiedlichen Nitrogruppen des CTFMs, - 600 bis + 600 mV (---), - 900 bis +600 mV (—), SR  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , RE: Ag|AgCl, GE: Platin



**Abb. 53** Absorptionsspektren für CTFM (**35**) (—) im Vergleich zum polymerisierbaren CTF-Derivat **37** (----) in Ethanol

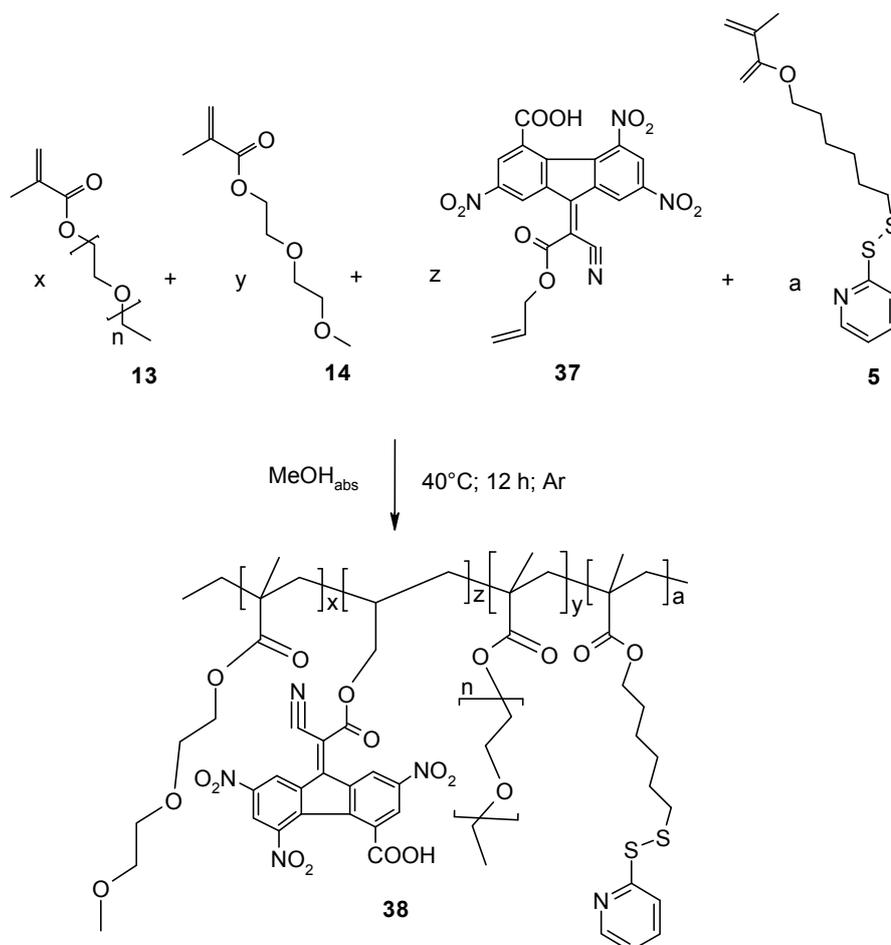
### 3.1.5.2 PEGMA-CTF-SH (**38**)

CTFM, bisher als Monoschicht auf Glaskohlenstoff-<sup>[148]</sup> bzw. Goldelektroden<sup>[144]</sup> oder in Kohlenstoffpaste-Elektroden<sup>[143]</sup> verwendet, sollte in ein Redoxpolymer integriert werden. Dazu musste zunächst ein polymerisierbares Derivat synthetisiert werden. 4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenol (**33**) wurde mit Allylcianoacetat (**36**) und einer katalytischen Menge Piperidin umgesetzt. Es entstand das violette (4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenylid)allylcianoacetat (**37**) (Abb. 54) in einer Ausbeute von 54 % in Analogie zur Literatur.<sup>[148]</sup> Dadurch wurde erstmals ein polymerisierbares CTF-Mediatormonomer synthetisiert.



**Abb. 54** Darstellung des polymerisierbaren 4-Carboxy-2,5,7-Trinitrofluorenon-Derivats **37**

**37** konnte nun zusammen mit Triethylglykolmonoethylethermethacrylat **13**, Diethylglykolmethylethermethacrylat **14** und 6-(Pyridin-2-yl-disulfanyl)hexylmethacrylat **5** copolymerisiert werden (Abb. 55). Nach der Aufreinigung wurde ein dunkelrotes Gel **38** mit einer Ausbeute von 93 % erhalten.

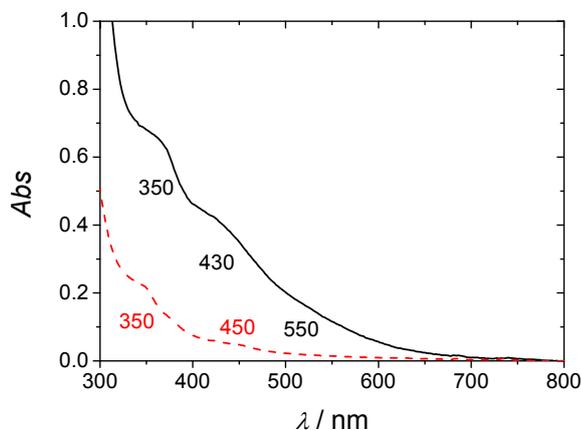


**Abb. 55** Synthese von PEG-CTF-SH **38**

Das mittels GPC ermittelte, apparente Molekulargewicht beträgt 1100 Da. Damit muss hier von einem Oligomer gesprochen werden. Die Polydispersität von 1.6 zeigte eine weitgehend gleichmäßige Strukturverteilung der Oligomerketten auf. Die Ausbeute von 85 % zeigte die Umsetzung nahezu aller Monomere. Die Nitrogruppen wirken aufgrund ihrer mesomeren Struktur als Elektronenfänger und inhibieren die Polymerisation. Es kommt frühzeitig zum Kettenabbruch. Kurze Polymerketten wurden hier erwartet, jedoch wurde eine so starke Inhibition der Polymerisation nicht vorausgesehen.

Um längere Polymerketten zu erlangen, sollte zukünftig zuerst **36** copolymerisiert werden und erst im Anschluss der Umsatz mit dem 4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenol erfolgen.

Die erfolgreiche Copolymerisation des Mediators wurde durch Absorptionsexperimente und elektrochemische Untersuchungen bestätigt. In den Absorptionmessungen (Abb. 56) zeigte das Oligomer **38** ein Absorptionsmaximum bei 350 nm vergleichbar mit dem des polymerisierbaren Monomers **37**. Das Absorptionsmaximum bei 450 nm von **37**, wurde im Polymer um 20 nm hypsochrom auf 430 nm verschoben. Diese Verschiebung deutet auf eine größere benötigte Anregungsenergie als für das Monomer hin, begründet in der Reaktion der Vinyl- zur Alkylgruppe während der Polymerisation.

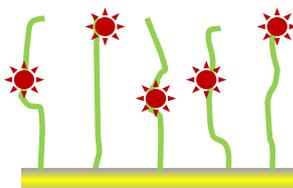


**Abb. 56** Absorptionsspektren für PEGMA-CTF-SH **38** (—) im Vergleich zu Allyl-CTF **37** (----) in Ethanol

Mit einer PEGMA-CTF-SH-modifizierten Goldelektrode wurde, nach der Aktivierung, ein Redoxpotential von +190 mV, vergleichbar mit einer CTFM-Monoschicht auf einer Goldelektrode (+120 mV vs. Ag|AgCl), ermittelt. Bei einer Peakseparation von 100 mV handelt es sich um einen quasi-reversiblen ET-Prozess. Im Vergleich zu CTFM-Monoschichten auf GCE oder makroporösen Goldelektroden ist das Potential um ~200 mV positiv verschoben.<sup>[142, 145, 148, 150, 151]</sup> Dagegen zeigte ein auf Zirconiumphosphat immobilisiertes CTF-Derivat, integriert in eine Kohlenstoffpaste-Elektrode ein Redoxpotential von +230 mV (Ag|AgCl).<sup>[143]</sup> Diese Vergleiche zeigen, dass das Elektrodenmaterial, die

Mediatorumgebung und der Mediator selbst entscheidend sind für das Redoxpotential. Die Oberflächenbelegung betrug  $3.1 \cdot 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$  und die ermittelte  $k_s$   $19 \text{ s}^{-1}$ . Damit war die  $k_s$  ca. 6.5fach größer als für eine Kohlenstoffpaste-Elektrode mit 4-Carboxy-2,5,7-trinitrofluorenon mit einer um Faktor zehn kleineren Oberflächenbelegung ( $4.1 \cdot 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$ ).<sup>[143]</sup>

Die Scanratenvariation resultierte in einer linearen Abhängigkeit des Peakstroms von der Wurzel der Scanrate und erfüllte damit, im Gegensatz zu den anderen Polymeren die Randles-Sevcik-Gleichung für diffusionsabhängige Prozesse. Die Ankopplung des Oligomers wurde allerdings in vorhergehenden Experimenten bestätigt. Es ist bekannt, dass immobilisierte Redoxpolymere mit langen Mediatorlinkern diffusionsabhängige Redoxprozesse aufweisen.<sup>[48, 180, 190]</sup> Die angekoppelten PEGMA-CTF-SH-Oligomerketten bilden büstenartige Strukturen auf der Elektrodenoberfläche. Diese Ketten sind im Gegensatz zu den anderen Polymeren nur durch eine Bindung auf der Oberfläche fixiert. Diese Oligomerketten können relativ flexibel an der Elektrodenoberfläche hin und her wiegen und vermitteln so den Eindruck eines diffundierenden Mediators (Abb. 57).



**Abb. 57** Modellvorschlag für die PEGMA-CTF-SH-Ankopplung auf Goldelektroden

Der Kontaktwinkel für dieses Oligomer beträgt  $26^\circ$ . Dieser Wert ist im Vergleich zu den anderen Polymeren sehr gering und steht für eine vollständig benetzte Oberfläche.<sup>[182]</sup> Er bestätigt die Modifizierung der Goldoberfläche mit rasenähnlichen Oligomerketten.

Die Lagerung der Elektroden unter trockenen Bedingungen bei RT zeigte eine relative Stabilität des Redoxpotentials über 60 Tage. Das Potential schwankte um 1.5 % und der Peakstrom um 25 %. Die Schwankungen sind auf die unterschiedlichen Messbedingungen an den unterschiedlichen Tagen dieses langen Zeitraums zurückzuführen.

Die LCST des PEGMA-CTF-SH betrug  $28^\circ\text{C}$  und ist damit denen der PEGMA-RuPD-Polymere sehr ähnlich. Sie liegt oberhalb der Raumtemperatur und damit ist das Oligomer bei Raumtemperatur hydratisiert und wasserlöslich. Die sehr kurzen Oligomerketten bilden eine sehr hydrophile Oberfläche, wie auch der Kontaktwinkel gezeigt hat. Auch das CTF erhöht die Hydrophilie und damit erhöht es die LCST, zu Werten ähnlich zu OEGMA-MEO<sub>2</sub>-MA-Copolymeren.<sup>[79]</sup>

Der erwartete Wert für die Abhängigkeit des Potentials vom pH-Wert für einen 2e-2H-Prozess beträgt  $-58 \text{ mV/pH}$ . Der für dieses Oligomer ermittelte Wert betrug nur

- 13.2 mV/pH. Die kurzen Oligomerketten wirken mit ihren Sauerstoffatomen und –OH-Gruppen als Puffer. Die Diffusion der Protonen durch die Oligomerschicht zum Mediator ist erschwert.<sup>[191]</sup>

### **3.1.5.3 Zusammenfassung**

Erstmals wurde ein polymerisierbares Derivat des Mediators 4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenol (CTF) für NAD-abhängige Enzyme synthetisiert und in ein hydrophiles Oligomer integriert. Dieses wurde mittels Absorptionsspektrometrie bestätigt. Das Oligomer wurde über interne Thiolgruppen direkt auf Goldoberflächen immobilisiert. Diese Oberflächen zeigten aufgrund der sehr kurzen Oligomerketten einen sehr hydrophilen Kontaktwinkel. Die PEGMA-CTF-SH-modifizierten Goldelektroden zeigten ein Redoxpotential von + 190 mV und die Geschwindigkeitskonstante für den heterogenen Elektronentransfer betrug  $19 \text{ s}^{-1}$ . Es wurde eine LCST von 28°C ermittelt. Die modifizierten Elektroden waren über einen Zeitraum von 60 Tagen relativ stabil in Peakpotential und Peakstrom. Der pH-Wert hatte einen geringen Einfluss auf das Peakpotential.

### 3.1.6 Zusammenfassung Polymere

Es wurden Polymere unterschiedlicher Polymergerüste, Molekülmassen, Redoxzentren und Ankopplungsgruppen in einfachen Ein-Stufen-Synthesen hergestellt. In Tabelle 3 sind die wichtigsten physiko- und elektrochemischen Eigenschaften der neu synthetisierten, hydrophilen Redoxpolymere aufgeführt.

**Tabelle 3** Zusammenfassung der wichtigsten physiko- und elektrochemischen Parameter der Polymere

Polymer	MW kD	$E^0$ / mV (Ag AgCl)	Absorption /		LCST / °C	$k_s$ s <sup>-1</sup>	Stabili- tät / d	mV / pH
			nm	I ~ SR				
PNIPAMFoxy	36	+ 370	420	~	30	80	5 bis >13	-7
PEGMA-Fc-SH	4	+ 400	450	~	< 16	70	8 bis >20	n.d.
PEGMA-Fc-SS	8	+ 400	450	~	16	50	8 bis >20	-8
PNIPAM-RuPD-NH <sub>2</sub>	13	-320/+10/+240	370, 450	~	47	20	> 40	n.d.
PEGMA-RuPD-SH	25	-200/+230	370, 450	~	30	n.d.	n.d.	-77
PEGMA-RuPD-SS	30	-300/+340	370, 450	~	31	n.d.	n.d.	-53
PEGMA-CTF-SH	1	+ 190	350, 480	I ~ √SR	28	19	> 60	-13

Es wurden zwei Arten von hydrophilen Polymeren, PNIPAM- und PEGMA-basiert, synthetisiert. Erstmals wurde ein polymerisierbares 4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenol (CTF)-Derivat synthetisiert und in ein hydrophiles Oligomer integriert. Die Integration der drei verschiedenen Mediatoren, Ferrocen (Fc), 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (PD) und CTF in die Polymerketten konnte mit UV/Vis-Spektrometrie und Elektrochemie bestätigt werden.

Es wurden erstmals hydrophile, dreidimensionale Redoxpolymernetzwerke kovalent auf Elektrodenoberflächen immobilisiert. Die Ankopplung über interne oder externe Thiol- oder Disulfidlinker in ein oder zwei einfachen Schritten konnte für alle Polymere mittels Kontaktwinkelmessungen und der Elektrochemie gezeigt werden. Die Oberflächenbelegung für alle Polymere ergab Werte um  $10^{-11}$  mol cm<sup>-2</sup> und spricht für dünne Redoxschichten, die kurze, effiziente Elektronentransferwege ermöglichen.<sup>[180]</sup> Der höhere Mediatoranteil in den PEGMA-Polymeren spiegelte sich in der Oberflächenbelegung nicht wieder. Möglicherweise ist der Elektronentransfer innerhalb der Polymere nicht möglich. Durch die Ankopplung der Redoxhydrogele über Chemisorption wurden hydrophile, selbstassemblierte Polymerschichten geschaffen, welche eine Kombination aus Mediatormonoschichten und flexiblen, dreidimensionalen Polymerstrukturen an den Elektrodenoberflächen bilden.

Die Unterschiede in den elektrochemischen Parametern ergaben sich primär aus den unterschiedlichen Mediatoren. Die Redoxpotentiale der Polymere lagen im Bereich von - 300

bis + 400 mV. Die größten Geschwindigkeitskonstanten für den heterogenen Elektronentransfer von  $50\text{-}80\text{ s}^{-1}$  wurden durch die Fc-Polymere erreicht. Für die PD- und CTF-modifizierten Polymere betragen sie  $\sim 20\text{ s}^{-1}$ .

Der Einfluss der Mediatormenge im Polymer auf die Ergebnisse ließ sich in den LCST-Werten und Redoxpotentialen ablesen. Der hohe Anteil von 14.5 % in den PEGMA-Polymeren (im Vergleich zu 1.5 % in den PNIPAM-Polymeren) war der Grund für die geringeren LCST der PEGMA-Fc-Polymere und den fehlenden Redoxpeak für das PD in den PEGMA-RuPD-Polymeren.

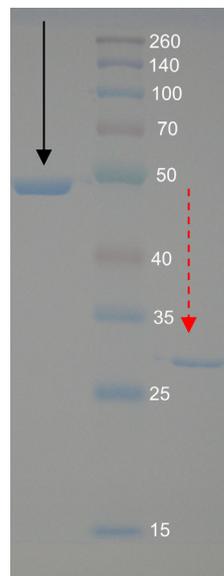
Die LCST von fünf der sieben hydrophilen Polymere lag wie erwartet oberhalb der Raumtemperatur bei  $\sim 30^\circ\text{C}$ . Die PEGMA-Fc-Polymere bildeten bei Raumtemperatur hydrophobere Oberflächen als die anderen Polymere aus. Alle Elektroden zeigten eine Lagerungsstabilität von mindestens 20 bis zu 60 Tagen (trocken, bei Raumtemperatur), wobei die Fc-Elektroden einen Abfall innerhalb der ersten 5-8 Tage zeigten. Eine Erniedrigung des Potential mit steigendem pH-Wert entsprechend dem Nernst-Verhalten ( $-58\text{ mV/pH}$ ) wurde nur für die RuPD-Polymere beobachtet, die anderen Polymere waren vom pH-Wert weitestgehend unabhängig.

Die neuen hydrophilen Redoxpolymere können für die Kontaktierung von Oxidoreduktasen eingesetzt werden. Ihr Potentialspektrum reicht von  $-300$  bis  $+400\text{ mV}$  (Ag|AgCl).

## 3.2 Kontaktierung von Oxidoreduktasen mit schaltbaren Redoxpolymeren

### 3.2.1 Allgemeines

Die Kopplung von zwei Oxidoreduktasen unterschiedlicher Katalysemechanismen mit den neuen Redoxpolymeren sollten realisiert werden. Exemplarisch wurden die lösliche, Pyrrolochinolinchinon-abhängige Glucosedehydrogenase (PQQ-GDH oder sGDH) aus *Acinetobacter calcoaceticus* und die Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-abhängige Glucosedehydrogenase (NAD-GDH) aus *Pseudomonas sp.* verwendet. Die PQQ-GDH besteht aus zwei identischen Untereinheiten (UE) mit je 50 kD. Die NAD-GDH wird aus vier identischen UE mit je 30 kD aufgebaut. Die Reinheit und Molekulargewichte der Enzyme wurden mittels Gelelektrophorese (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese SDS-PAGE) überprüft und bestätigt (Abb. 58). Die SDS-PAGE ist eine denaturierende Methode, die UE der Enzyme werden dabei voneinander getrennt. Daher sind nur die Größen der UE nicht aber ihre Anzahl abzulesen. Die PQQ-GDH zeigte eine Bande bei 50 kD für ihre zwei UE, für die NAD-GDH wurde eine Bande von 30 kD für ihre vier UE ermittelt. Die Aktivitäten der Enzyme wurden regelmäßig vor ihrer Verwendung spektrometrisch überprüft. Die Aktivität für PQQ-GDH betrug  $\sim 100 \text{ U mg}^{-1}$  und für NAD-GDH wurde eine Aktivität von  $\sim 25 \text{ U mg}^{-1}$  ermittelt.



**Abb. 58** Ausschnitt einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. 10 %iges Gel. Schwarzer Pfeil: PQQ-GDH, roter Pfeil: NAD-GDH; Mitte: Marker von oben nach unten: 260, 140, 100, 70, 50, 40, 35, 25, 15, 10 kD

Die Anwendungsmöglichkeiten von Redoxpolymeren in Kombination mit Enzymen in der Biosensorik sind vielfältig. Durch die Kontaktierung der Oxidoreduktasen mit Elektroden können sie z.B. dem Aufbau von Enzymsensoren oder Immunoassays mit elektrochemischer Detektion dienen. Für den Aufbau von Enzymsensoren muss das Enzym an der Elektrode immobilisiert werden. Die elektrochemische Detektion weiterer Analyten kann direkt über oberflächengebundene oder indirekt über nicht gebundene, enzymmarkierte Moleküle erfolgen. In dieser Arbeit sollte der Einsatz der Polymere zur Detektion der enzymmarkierten Antikörper (AK) für elektrochemische Immunoassays untersucht werden.

Dazu wurde zunächst die Interaktion der gelösten Enzyme mit den neuen Redoxpolymeren untersucht. Zur Charakterisierung des ET zwischen einem Enzym und dem Mediator kann die homogene Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung nach der Methode von Nicholson und Shain bestimmt werden.<sup>[192]</sup> Bei gesättigter Substratkonzentration und einer diffusionslimitierten Elektrodenreaktion des Mediators kann aus den experimentell erhaltenen Daten der Katalysefaktor  $I_{\text{kat}}/I_{\text{diff}}$  ( $I_{\text{kat}}$ : katalytischer Strom;  $I_{\text{diff}}$ : Diffusionsgrenzstrom) ermittelt werden. Damit könnte aus der Arbeitskurve in Abbildung 14 in<sup>[192]</sup> der entsprechende kinetische Parameter  $k_f/a$  bestimmt werden (mit  $a = zFv/RT$ ;  $z$  Anzahl der Elektronen,  $F$  Faraday-Konstante,  $v$  Scanrate,  $R$  allgemeine Gaskonstante,  $T$  absolute Temperatur). Aus diesem Parameter ließe sich über mehrere mathematische Zusammenhänge die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung ermitteln. In dieser Arbeit steht die aufwendige Bestimmung aller kinetischer Parameter nicht im Vordergrund, daher wird der Katalysefaktor  $I_{\text{kat}}/I_{\text{diff}}$  für die Vergleiche innerhalb der Polymere.<sup>[104, 193]</sup> Ein großer Katalysefaktor spricht für einen effizienten ET.

Das Enzym-Redoxpolymer-Paar mit den höchsten Katalysefaktoren soll für den Aufbau eines Immunoassays eingesetzt werden. Untersucht wurde der Elektronentransfer zwischen Enzymen in Lösung und Redoxpolymer-funktionalisierten Elektroden. Die Charakterisierung immobilisierte Enzyme wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht verfolgt.

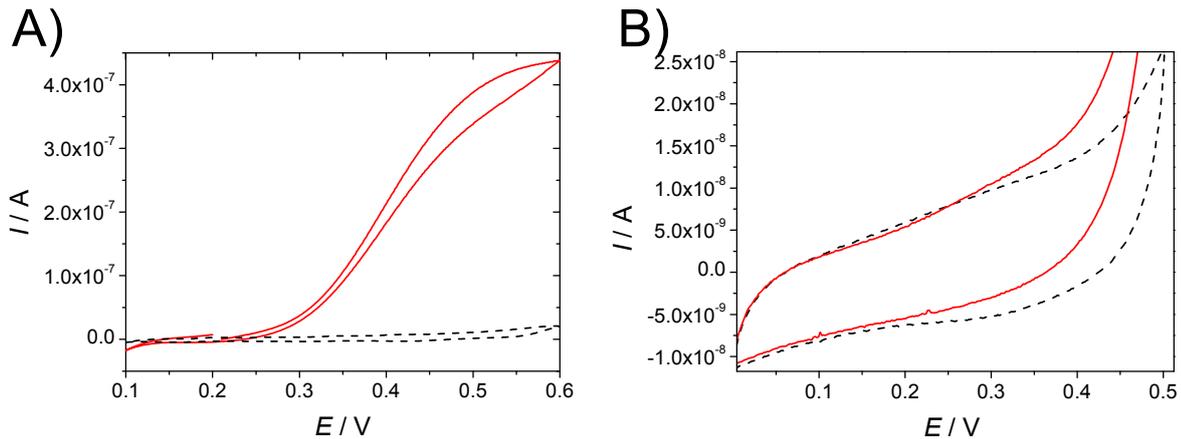
### 3.2.2 Kontaktierung der Oxidoreduktasen mit den Redoxpolymeren

#### 3.2.2.1 *PNIPAMFoxy*

PNIPAMFoxy-modifizierte Goldelektroden wurden für die elektrochemische Detektion der Enzymkatalyse von PQQ- und NAD-GDH verwendet. Ein Elektronentransfer vom reduzierten Coenzym über Fc zur Elektrode konnte durch einen katalytischen Stromanstieg in cyclischen Voltammogrammen beobachtet werden (Abb. 59). Der Katalysefaktor  $I_{\text{kat}}/I_{\text{diff}}$  beträgt für die NADH-Oxidation 1,2, wohingegen der Faktor für die PQQH<sub>2</sub>-Oxidation mit 25, mehr als das 20fache beträgt. Der ET vom Enzym mit prosthetischem PQQ-Coenzym zum Mediator ist

deutlich schneller und effizienter als der ET für NAD-GDH mit dem frei beweglichen Coenzym.

Das Fc ist sowohl in Lösung als auch im Polymer, wie bereits mehrfach gezeigt,<sup>[41, 105, 115]</sup> ein effizienter Elektronenüberträger für die 2e-2H-übertragenden Enzymkatalysen, obwohl es ein 1e-Überträger ist. Ein Poly(ethylenimin)-Ferrocen-NAD-Polymer (PEI-Fc-NAD) wird in der Literatur zur Immobilisierung von Mediator und Coenzym und zur Kontaktierung von NAD-abhängiger Alkoholdehydrogenase eingesetzt.<sup>[41]</sup>

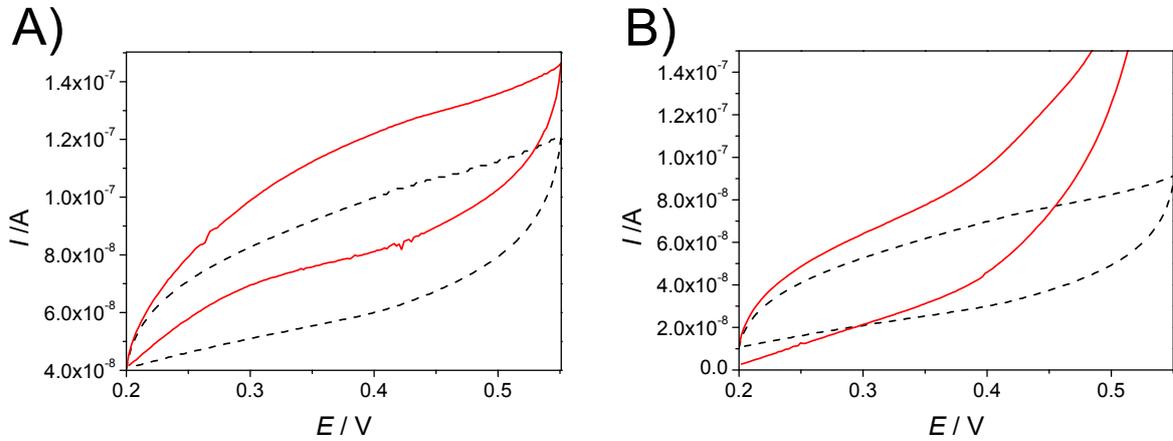


**Abb. 59** Cyclische Voltammogramme einer PNIPAMFoxy-modifizierten Goldelektrode. A) in HBS-Puffer pH 7.5 (----) und mit PQQ-GDH (50 µg ml<sup>-1</sup>) + 5 mM Glucose (—). B) in HBS-Puffer pH 8 (----) und mit NAD-GDH (50 µg ml<sup>-1</sup>) + 2.5 mM NAD<sup>+</sup> + 100 mM Glucose (—). SR 2 mV s<sup>-1</sup>, RE: Ag|AgCl, GE: Platin

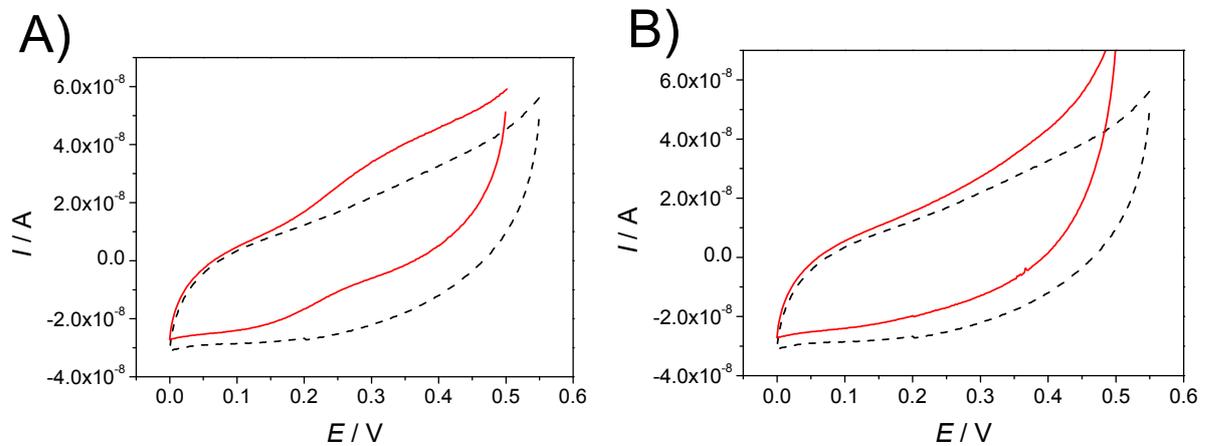
### 3.2.2.2 *PEGMA-Fc-SS und PEGMA-Fc-SH*

Für die PEGMA-Polymere mit Fc-Redoxzentren ergaben sich für beide Polymere und beide Enzyme ähnliche  $I_{\text{kat}}/I_{\text{diff}}$ -Faktoren von rund 1.3 (Abb. 60 und 61). Der Faktor ist für NAD-GDH vergleichbar mit dem für PNIPAMFoxy. Für die PQQ-GDH ist der Faktor ~ 20fach geringer als mit PNIPAMFoxy. Zwei Effekte sind für diesen deutlich langsameren ET für die PQQ-GDH verantwortlich: 1. sind die PEG-Seitenketten bekannte Liganden für Ca<sup>2+</sup>-Ionen. Sie binden das für die PQQ-GDH essentielle Ca<sup>2+</sup> und verringern somit die Anzahl aktiver Enzyme. 2. zeigen diese Polymere bei RT eine Dehydratisierung. Daher bilden sie hydrophobere Oberflächen aus, die eine Interaktion mit dem Coenzym behindern. Der ET von der NAD-GDH zum Mediator konnte durch Verwendung des PEG nicht verbessert werden. Der ermittelte  $I_{\text{kat}}/I_{\text{diff}}$ -Faktor ist unverändert im Vergleich zu den PNIPAMFoxy-Ergebnissen. Die geschwindigkeitsbestimmende Diffusion und damit Oxidation des gelösten NADH zwischen Enzym und Elektrode wird durch Verwendung des PEGMA anstelle des PNIPAM weder positiv noch negativ beeinflusst. Der Ferrocen-Mediator kann als Grund für

den schlechten ET ausgeschlossen werden, aufgrund der vorliegenden Ergebnisse mit PNIPAMFoxy und seiner Verwendung in vielzähligen Sensoren.<sup>[120, 125, 194]</sup>



**Abb. 60** Vergleich der Enzymkatalysen durch PEGMA-Fc-SS-modifizierte Goldelektroden: A) in HBS pH 7.5 (---) mit  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  PQQ-GDH + 5 mM Glucose (—) bzw. B) in HBS pH 8 (--) mit  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  NAD-GDH + 2.5 mM  $\text{NAD}^+$  + 100 mM Glucose (—), SR  $2 \text{ mV s}^{-1}$ , RE: Ag|AgCl, GE: Platin

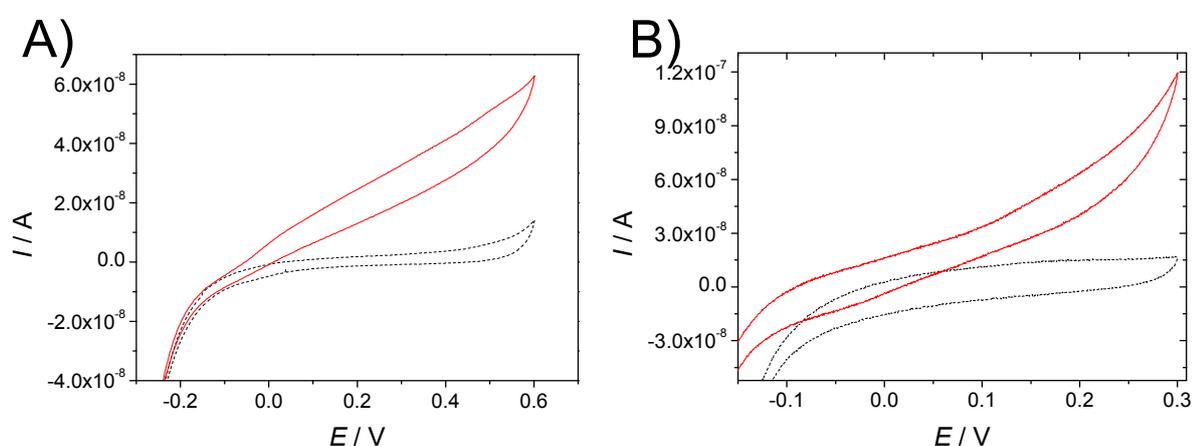


**Abb. 61** Vergleich der Enzymkatalysen durch PEGMA-Fc-SH-modifizierte Goldelektroden A) in HBS pH 7.5 (---) mit  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  PQQ-GDH + 5 mM Glucose (—) bzw. B) in HBS pH 8 (--) mit  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  NAD-GDH + 2.5 mM  $\text{NAD}^+$  + 100 mM Glucose (—), SR  $2 \text{ mV s}^{-1}$ , RE: Ag|AgCl, GE: Platin

### 3.2.2.3 PNIPAM-RuPD-NH<sub>2</sub>

Das zweite PNIPAM-Polymer zeigte für die PQQ-GDH bei +100 mV (Ag|AgCl) einen  $I_{\text{kat}}/I_{\text{diff}}$ -Faktor von ca. 20, vergleichbar zu dem Wert für PNIPAMFoxy. Der Faktor von 3 für NAD-GDH ist der höchste für dieses Enzym in dieser Arbeit ermittelte (Abb. 62). Das Hydrogel liegt bei Raumtemperatur in hydratisiertem, gequollenem Zustand vor. Die Wechselwirkung

mit beiden Enzymen wird in gewünschter Weise begünstigt. Die Ligandengesteuerte Elektrokatalyse durch das PD konnte somit erfolgreich mit dem angekoppelten Hydrogel gezeigt werden. PD wurde bisher in Form von Os-<sup>[131, 132, 135]</sup> oder Ru-Metallkomplexen<sup>[28, 127, 133]</sup> in Lösung, Kohlenstoffpaste-Elektroden oder in adsorbierten Polymeren zur NADH-Oxidation eingesetzt. Das verwendete Elektrodenpotential eines quervernetzten Poly(vinylpyridin)-Os-PD-Polymers liegt bei + 150 mV (Ag|AgCl) für die Elektrokatalyse mit einer NAD-abhängige Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase<sup>[131]</sup> PNIPAM-RuPD-NH<sub>2</sub>-modifizierte Elektroden konnten nicht in gleichbleibender Qualität hergestellt werden. Bei der Herstellung der Elektroden wurde 3,3'-Dithiodi(propionsäure-N-hydroxysuccinimidylester) verwendet. Möglicherweise reagierte der NHS-Ester bereits vor Polymerzugabe mit dem Wasser aus der Luft.



**Abb. 62** Cyclische Voltammogramme einer PNIPAM-RuPD-NH<sub>2</sub>-modifizierten Goldelektrode. A) in HBS-Puffer pH 7.5 (-----) mit PQQ-GDH (50 µg ml<sup>-1</sup>) + 5 mM Glucose (---). B) in HBS-Puffer pH 8 (.....) mit NAD-GDH (50 µg ml<sup>-1</sup>) + 2.5 mM NAD<sup>+</sup> + 100 mM Glucose (---). SR 2 mV s<sup>-1</sup>, RE: Ag|AgCl, GE: Platin

### 3.2.2.4 PEGMA-RuPD-SS und PEGMA-RuPD-SH

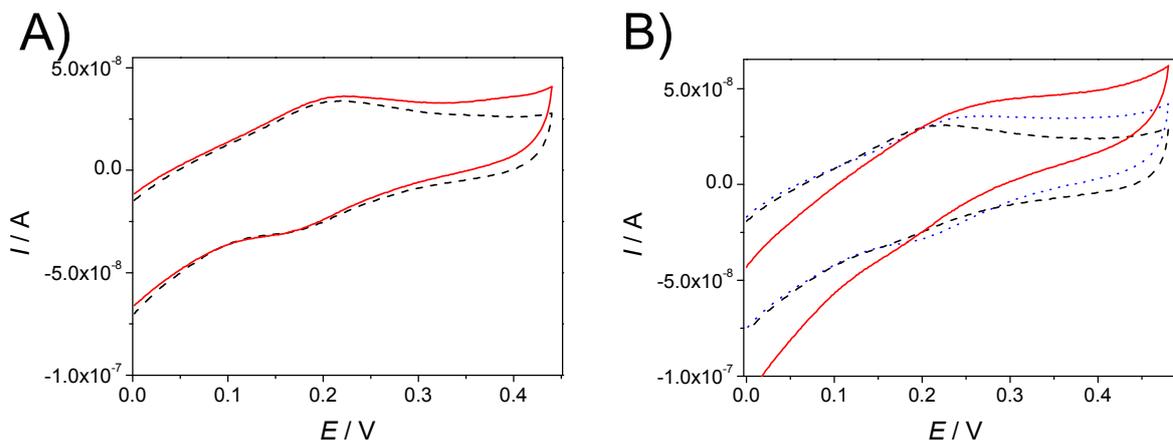
Die PEGMA-RuPD-Polymere zeigten mit beiden Enzymen keine elektrokatalytische Oxidation. Für die NAD-GDH wurde lediglich eine direkte Oxidation des NADH bei ca. + 500 mV (Ag|AgCl) ermittelt. Die Überspannung von ca. 1 V (Ag|AgCl), die normalerweise für die Elektrooxidation notwendig ist, konnte damit um 500 mV herabgesetzt werden.<sup>[44]</sup> Eine Erklärung für die ausbleibende Elektrokatalyse lässt sich mit dem Fehlen des Redoxpeaks für PD in den Voltammogrammen geben. Der fehlende PD-Peak bedeutet entweder, dass kein PD im Polymer ist, was durch die Absorptionsspektrometrie ausgeschlossen wurde, oder dass es durch die Polymermatrix abgeschirmt wird. Sowohl die PEG-Ketten als auch die Thiolschutzgruppe können den PD-Liganden des RuPD-Komplexes ausgetauscht haben.

Weiterhin sind die PEG-Ketten in der Lage, das für die Aktivität der PQQ-GDH essentielle  $\text{Ca}^{2+}$  zu binden und so das Enzym zu inaktivieren. Das kleine NADH-Molekül kann offensichtlich durch den Polymerfilm hindurch zur Elektrode diffundieren und wird dort oxidiert. Das oxidierte NADH-Molekül kann nicht zum Enzym zurückkehren oder ist eine inaktive Form.<sup>[44]</sup>

### 3.2.2.5 PEGMA-CTF-SH

CTF ist ein vielfach beschriebener Mediator für NAD-abhängige Enzyme. Eine Interaktion zwischen Enzym, Mediator und Elektrode konnte sowohl für PQQ- als auch NAD-GDH beobachtet werden. Der Mediator war in seiner modifizierten Form zum ET zwischen Enzym und Elektrode geeignet. Damit wurde dieser Mediator erstmals in ein Oligomer integriert und zum Nachweis einer Enzymkatalyse verwendet.

Der Katalysefaktor  $I_{\text{kat}}/I_{\text{diff}}$  für PQQ-GDH mit 1.3 ist im Vergleich zu den Ergebnissen mit PNIPAMFoxy genauso gering, wie für die PEGMA-Fc-Polymere. Der Faktor für NAD-GDH ist mit 1.4 wenig höher als für PNIPAMFoxy und kann durch Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  auf 1.9 gesteigert werden (Abb. 63). Durch die Calciumzugabe wird einerseits ein Komplex zwischen NAD und CTF aufgebaut, andererseits kommt es zu einer Strukturänderung des Polymers. Die hier ermittelten  $I_{\text{kat}}/I_{\text{diff}}$ -Faktoren für NAD- und PQQ-GDH entsprechen denen der PEGMA-Fc-Polymere. Auch hier scheint der ET durch die PEG-Ketten behindert zu sein.

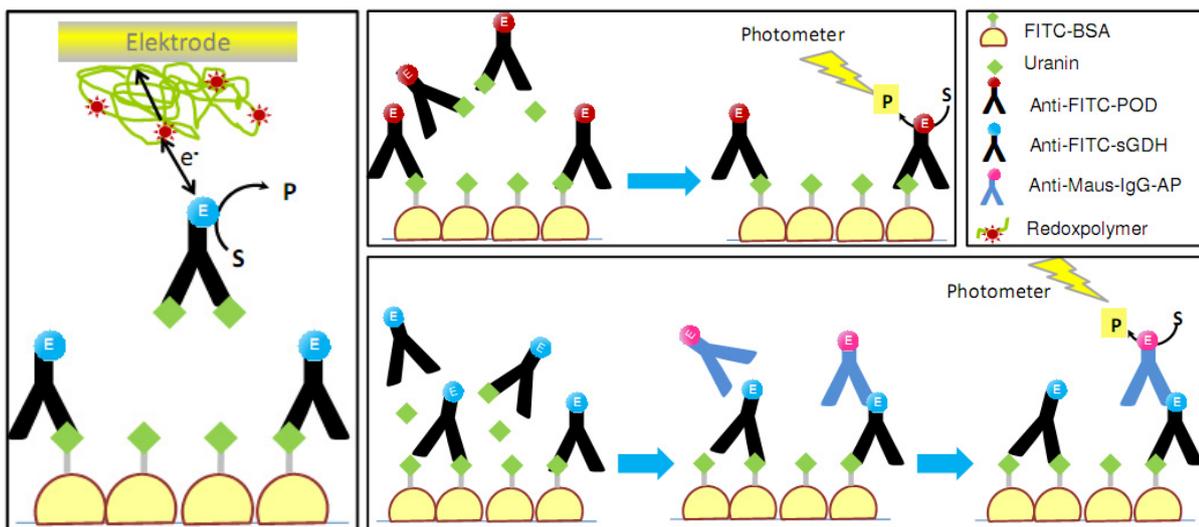


**Abb. 63** Cyclische Voltammogramme einer PEG-CTF-SH-modifizierten Goldelektrode. A) in HBS-Puffer pH 8 (----) mit PQQ-GDH ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) + 5 mM Glucose (—). B) in HEPES/KCl-Puffer pH 8 (----) mit NAD-GDH ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) + 2.5 mM  $\text{NAD}^+$  + 100 mM Glucose (—) und 50 mM  $\text{CaCl}_2$  (.....). SR  $10 \text{ mV s}^{-1}$ , RE: Ag|AgCl, GE: Platin

### 3.2.3 Kompetitiver Immunoassay

Zur Entwicklung eines kompetitiven Immunoassays wurde PNIPAMFoxy zusammen mit der PQQ-GDH (auch sGDH) ausgewählt, da hier die höchste Geschwindigkeitskonstante für den heterogenen ET und für sGDH der höchste  $I_{\text{kat}}/I_{\text{diff}}$ -Faktor bestimmt wurde.

Es sollte ein kompetitiver Immunoassay mit elektrochemischer Detektion aufgebaut werden. Als Modellsystem wurde Fluorescein (FITC) und ein PQQ-GDH-markierter Anti-FITC-Antikörper (Anti-FITC-sGDH) verwendet. Im kompetitiven Assay wird ein FITC-Albumin-Konjugat (FITC-BSA) auf einer Oberfläche immobilisiert. Wasserlösliches Natrium-FITC-Salz (Uranin) und Anti-FITC-sGDH werden dazugegeben, BSA-gebundenes und gelöstes FITC konkurrieren um die Antikörperbindungsstellen (Abb. 64 links). Eine hohe Menge an gelöstem Uranin bedeutet eine hohe AK-Konzentration im Überstand, wenig Uranin bedeutet dagegen, dass wenig AK im Überstand nachweisbar ist. Die elektrochemische Detektion der AK im Überstand, erfolgt über die Quantifizierung des Enzymlabels. Dieses Detektionsprinzip ist vergleichbar mit der Bestimmung von PQQ-GDH in Lösung.



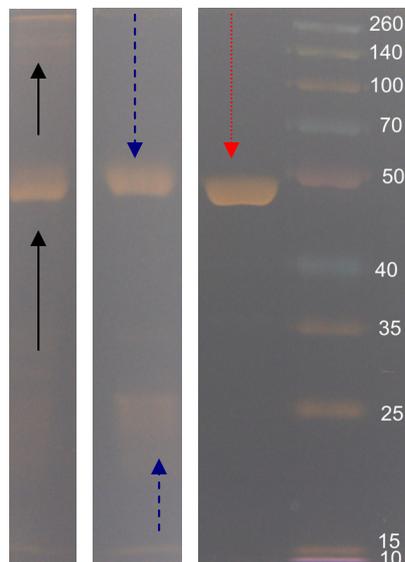
**Abb. 64** Schema für die elektrochemische (links) und optische (rechts) Detektion des Immunoassay

Vorarbeiten für den elektrochemischen Immunoassay bestanden in der Konjugatherstellung und der Optimierung des Tests im optischen Format.

Die Konjugate wurden über die Einführung einer Maleimidgruppe in das Enzym, mit sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat) und einer Thiolgruppe in den AK, mit SATP (*N*-Succinimidyl-*S*-Acetylthiopropionat), hergestellt. Nach Vereinigung beider modifizierter Moleküle entsteht das Enzym-AK-Konjugat. Die Konjugatmoleküle wurden mittels Affinitätschromatographie mit einer Nickel-Iminodiessigsäure(Ni-IDA)-modifizierten Säule aufgereinigt. Die AK binden mit ihrem FC-Teil

an die Ni-IDA.<sup>[195]</sup> Es werden konjugierte und freie AK gebunden. Überschüssiges Enzym wird jedoch entfernt. Die Kontrolle der Konjugate erfolgte mittels SDS-PAGE und Aktivitätstests. Ist eine Aktivität zu verzeichnen, kann sie nur von einem Konjugat herrühren. Die Enzymaktivität für das Konjugat betrug  $30 \text{ U mg}^{-1}$  und damit  $\sim 1/3$  der Aktivität des Enzyms.

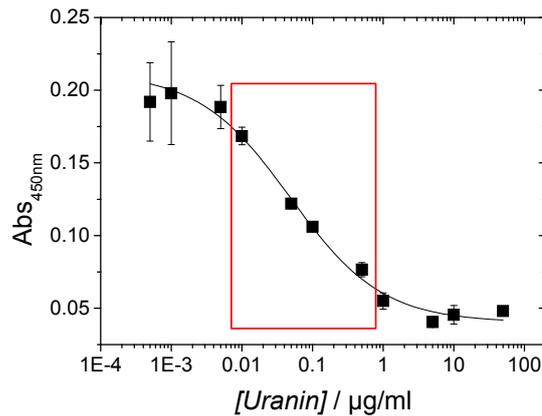
Im SDS-PAGE-Gel war einer Erhöhung der Molekulargewichtsbanden (MW) zu verzeichnen (Abb. 65). Der unkonjugierte IgG-AK wies zwei verschieden große MW-Banden auf, resultierend aus seinen schweren ( $\sim 50 \text{ kD}$ ) und leichten ( $23 \text{ kD}$ ) Ketten. Für die PQQ-GDH war eine Bande bei  $\sim 50 \text{ kD}$  zu verzeichnen. Für das Konjugat wurden deutliche Banden um  $150$  bis  $\geq 260 \text{ kD}$  erhalten. Dabei handelt es sich um Konjugate aus den schweren oder leichten Ketten mit einem oder mehreren Enzymmolekülen. Die Bande bei  $\sim 50 \text{ kD}$  stammt von unkonjugierten AK-Ketten.



**Abb. 65** Ausschnitte einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (invertiert dargestellt). 10 %iges Gel. (—): PQQ-GDH-Antikörper-Konjugat, (---): IgG-Antikörper, (····): PQQ-GDH; Marker von oben nach unten: 260, 140, 100, 70, 50, 40, 35, 25, 15, 10 kD

Der optische Enzymimmunoassay zur Optimierung der Uraninmenge wurde mit einem POD-gelabelten Anti-FITC-Antikörper (Anti-FITC-POD) anstelle des Anti-FITC-sGDH durchgeführt. FITC-BSA wurde in den Vertiefungen (Wells) der Mikrotiterplatte immobilisiert und Anti-FITC-POD gemeinsam mit Uranin dazugegeben. Die spektrometrische Detektion des gefärbten Produktes erfolgte bei  $450 \text{ nm}$  (Abb. 64 rechts oben). In diesem Fall bedeutet eine hohe Uraninkonzentration geringe Absorptionsintensitäten.

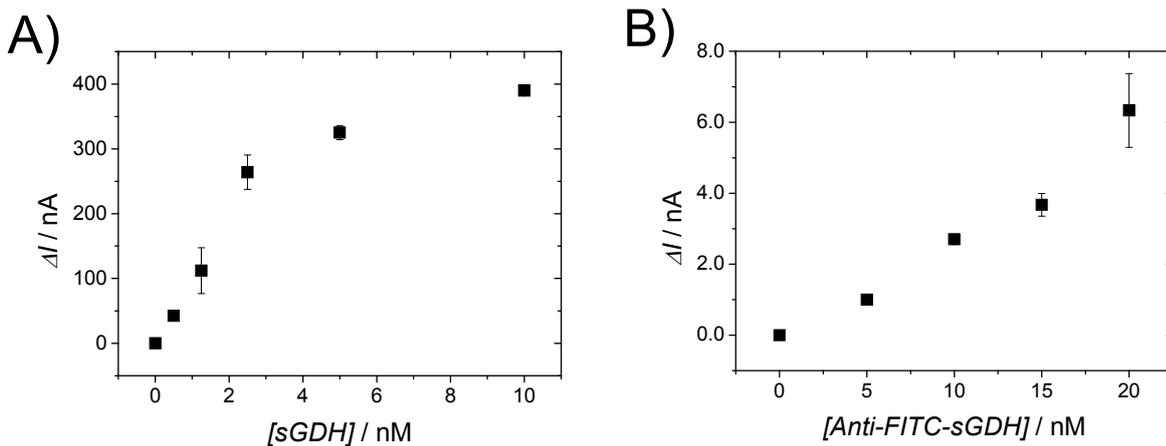
Bei der optimalen Konjugatverdünnung von  $1:10.000$  ergab sich für Uranin ein dynamischer, quasi-linearer Bereich zwischen  $0.01$  und  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  Uranin (Abb. 66).



**Abb. 66** Korrelation der Absorption mit der Uraninkonzentration im optischen kompetitiven Immunoassay mit Anti-FITC-POD-Konjugat, dynamischer, quasi-linearer Bereich: 0.01 – 0.5 µg ml<sup>-1</sup> (roter Kasten)

Die Bindung von Anti-FITC-sGDH an das FITC-BSA wurden in einem optischen Sandwich-Assay mit einem Sekundärantikörper (Anti-Maus-IgG-Alkalische Phosphatase, Anti-IgG-AP) bestätigt (Abb. 64 rechts unten). Der Substratumsatz des *p*-Nitrophenylphosphats durch die Alkalische Phosphatase des Anti-IgG-AP und der damit verbundenen Farbveränderung wurde bei 405 nm detektiert.

Nach erfolgreicher Konjugation und Optimierung der Assayparameter wurde zunächst die Konzentrationsabhängigkeit für sGDH und Anti-FITC-sGDH-Konjugat bei elektrochemischer Detektion aufgezeichnet (Abb. 67).



**Abb. 67** Konzentrationsabhängigkeiten der Stromsignale von PNIPAMFoxy-modifizierten Goldelektroden mit unterschiedlichen Konzentrationen an A) PQQ-GDH. HBS-Puffer pH 7.5 + 5mM Glucose und B) Anti-FITC-sGDH-Konjugat in HBS pH 7.5 + 5 mM Glucose, E + 400 mV, RE: Ag|AgCl, GE: Platin, n = 2

0.5 nM ( $50 \text{ ng ml}^{-1}$ ) PQQ-GDH war die geringste Konzentration, die an der PNIPAMFoxy-modifizierten Goldelektrode mit einer Stromänderung von 42 nA detektiert wurde (Abb. 67 A). Wollenberger *et al.* verwendeten eine mediatorspezifische Kohlenstoffpaste-Elektrode um die Nachweisgrenzen für die in Lösung befindlichen Meerrettich-Peroxidase (HRP) und Microperoxidase-11 (MP-11) zu ermitteln. Mit dem gelösten Mediator 1-(*N,N*-dimethylamin)-4-(4-Morpholin)benzen (AMB) wurde ein Detektionslimit von 250 pM (HRP) bzw. 10 nM (MP-11) erzielt.<sup>[21]</sup> Kulys *et al.* ermittelten mit einem ähnlichen Aufbau die Nachweisgrenzen für gelöste HRP und Laccase (*Polyporus pinsitus*) mit 0.15 bzw. 5.9 nM<sup>[196]</sup>. Die hier erstmals ermittelte Nachweisgrenze von 0.5 nM in Lösung befindlicher PQQ-GDH ist vergleichbar gering und daher vielversprechend für den Einsatz in elektrochemischen Immunoassays.

Für das Konjugat lag der lineare Messbereich zwischen 5 und 20 nM ( $1.25 - 5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ), 5 nM ( $1.25 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ) war die geringste nachgewiesene Konjugatmenge (Abb. 67 rechts). Ein empfindlicher Nachweis eines PQQ-GDH-AK-Konjugates war damit in dieser Arbeit erstmals möglich.

Die maximal benötigte Konjugatmenge von  $\sim 150 \text{ nM}$  pro Well für den Immunoassay wurde aus der ermittelten, maximalen Bindungskapazität von  $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  FITC-BSA berechnet. Durch die Messaufbau bedingten Verdünnungsschritte wurde dafür eine Stromänderung von max. 2.7 nA in der Messzelle erwartet. Es wurden zwei verschiedene Uraninmengen, eine hohe ( $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ) und eine niedrige ( $0.01 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ), getestet. Eine Unterscheidung zwischen der hohen und der geringen Konzentration über die in Lösung verbliebene Menge an Konjugat war mit dem hier verwendeten Messaufbau nicht eindeutig möglich. Eine Optimierung im Messaufbau, wie z.B. die Miniaturisierung der Elektroden für die direkte Messung in der Mikrotiterplatte, würde zu höheren Stromsignalen und damit zu einem größeren Messbereich führen. Der Aufbau eines Assays mit der Konkurrenz von markiertem und unmarkiertem Uranin um die AK-Bindungsstellen auf der Oberfläche und der direkten Detektion des ungebundenen FITC-Enzym-Konjugats könnte die Assayempfindlichkeit erhöhen.

Ein Vergleich mit bisher beschriebenen Immunosensoren ist schwierig, da die Quantifizierung des Enzymlabels nicht im Vordergrund standen. Es werden vorwiegend die umgesetzten Substratmengen, die Menge eines Redoxlabels wie Ferrocen oder die Analytmenge quantifiziert.<sup>[31, 33]</sup> Die detektierte Analytmenge ist sowohl von der Empfindlichkeit des Biosensors, als auch von der Affinität der Antikörper abhängig. So wird ein kompetitiver, amperometrischer Immunosensor, mit ähnlichem Messprinzip, für die Bestimmung von Lidocain verwendet. Hierbei wird der ET vom Enzym zum Fc und schließlich zur Elektrode in Abhängigkeit von der Analytkonzentration detektiert. Lidocain kann in einem Messbereich von 5 - 50  $\mu\text{M}$  bei Enzym- und Substratsättigung detektiert werden<sup>[197]</sup>. Dieser Messbereich liegt um Faktor 1000 höher als der in dieser Arbeit für das

Enzym-Konjugat ermittelte (5 – 20 nM). Ein elektrochemischer Verdrängungsassay für die Detektion von 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure (2,4-D) zeigt eine Nachweisgrenze von 25 nM 2,4-D.<sup>[198]</sup> Die in der Literatur beschriebenen Nachweisgrenzen erlauben die Schlussfolgerung, dass mit dem PQQ-GDH-Konjugat mit geeignetem Testaufbau ähnlich empfindliche Testsysteme erreicht werden können.

### 3.2.4 Zusammenfassung

Die elektrokatalytischen Eigenschaften der Polymere sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Es lassen sich folgende Aussagen über den Einfluss des Polymergerüsts, des Mediators und des Enzyms treffen.

**Tabelle 4** Zusammenfassung der Katalyseeigenschaften der Polymere

Polymer	Oxidations- potential / mV	$I_{kat} / I_{diff}$	
		NAD-GDH	PQQ-GDH
PNIPAMFoxy	+ 400	1.2	25
PEGMA-Fc-SH	+ 400	1.3	1.4
PEGMA-Fc-SS	+ 400	1.3	1.2
PNIPAM-RuPD-NH <sub>2</sub>	+ 100	3	20
PEGMA-RuPD-SH	+ 500	direkte Ox.	-
PEGMA-RuPD-SS	+ 500	direkte Ox.	-
PEGMA-CTF-SH	+ 200	1.4 → 1.9	1.3

**Polymer:**

PNIPAM > PEGMA

**Mediator:**

PQQ-GDH: Fc > PD >> CTF

NAD-GDH: Fc = PD = CTF

**Enzym:**

PQQ-GDH > NAD-GDH

Die besten Ergebnisse für die elektrochemische Oxidation der Oxidoreduktasen wurden für die PQQ-GDH mit PNIPAM-Polymeren und Ferrocen als Mediator (PNIPAMFoxy) erzielt. Auch als Matrix für PD war das PNIPAM gut geeignet. Die ermittelten Katalysefaktoren der PEGMA-Polymere zeigten für fünf von sieben Polymeren für beide Enzyme ähnliche Werte. Die abstoßende Wirkung der PEG-Seitenketten auf Proteine konnte durch die Copolymerisation mit Mediatoren und Ankopplungsgruppen nicht verringert werden. Der PD-Mediator und auch das CTF konnten ebenso wie das Fc für die Katalyse der Enzyme verwendet werden, allerdings mit erheblich geringerer Effektivität. Die Aktivität des CTF ließ sich durch Zugabe von Calciumionen um 40 % steigern.

Für die PEGMA-RuPD-Polymere ließ sich eine direkte Oxidation des NADH an der Elektrode bei + 500 mV verzeichnen.

Die zehnfache Mediatormenge in den PEGMA-Polymeren erhöhte die Katalysefaktoren nicht. Die Menge von 1.5 % war ausreichend für einen effizienten Elektronentransfer vom Enzym zur Elektrode. Durch die Verwendung der dreidimensionalen, hydrophilen Polymere

kann das Enzym in das Hydrogel einsinken. Somit steht eine große Oberfläche für die Interaktion mit den Redoxzentren zur Verfügung. Die Elektronentransferdistanz zur Elektrode ist durch den Einsatz kurzer Ankopplungslinker in den Polymerseitenketten klein.

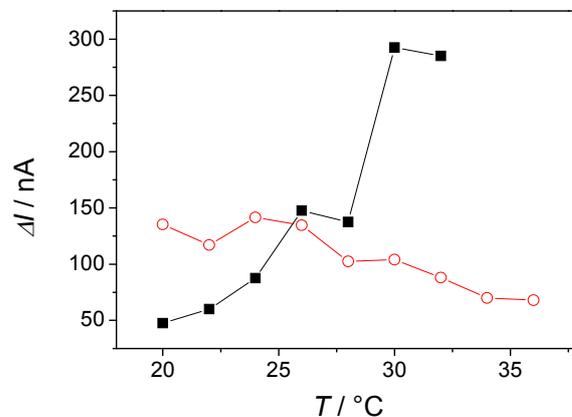
Der Unterschied in den Katalysemeechanismen der zwei Enzyme wurde in den Experimenten deutlich. Das Enzym mit dem löslichen Coenzym (NAD-GDH) zeigte deutlich geringere Katalysefaktoren. Das Polymermaterial ist hierbei nicht von entscheidender Bedeutung, da das Enzym nicht direkt damit in Verbindung treten muss, das frei bewegliche Coenzym übernimmt diese Aufgabe. Die Diffusion des  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  in der Polymermatrix und der Elektronenaustausch mit Enzym bzw. Elektrode sind hierbei entscheidend. Bei dem Enzym mit dem gebundenen Cofaktor (PQQ-GDH) befinden sich die am Elektronentransfer beteiligten Moleküle in räumlicher Nähe. Das Enzym zeigte deutliche Unterschiede in der Wechselwirkung mit den PEGMA- bzw. PNIPAM-Polymeren. Die Verwendung von PQQ-GDH in Kombination mit PEGMA-Polymeren ist ungeeignet, da die PEG-Seitenketten die essentiellen Calciumionen binden und das Enzym inaktivieren.

Erstmals wurde eine geringe Nachweisgrenze von 0.5 nM für PQQ-GDH und 5 nM für PQQ-GDH-Antikörper-Konjugat mit den neuen hydrophilen PNIPAMFoxy-modifizierten Elektroden gezeigt.

### 3.3 Schaltbare biohybride Redoxsysteme

#### 3.3.1 PNIPAMFoxy

PNIPAMFoxy ist ein thermoresponsives Redoxpolymer. Aus diesem Grund sollte der Einfluss der Temperatur auf das Messsignal untersucht werden. Sowohl PNIPAMFoxy als auch das Vergleichspolymer PNIPAMF (enthält keine Ankopplungsgruppe) waren über den Temperaturbereich von 20 bis 36°C redoxaktiv. Die Änderung des Stromsignals mit steigender Temperatur wurde in Anwesenheit von 10 nM sGDH (PQQ-GDH) und 10 mM Glucose verfolgt. Das immobilisierte Polymer zeigte eine Abnahme des Signals mit steigender Temperatur auf ca. die Hälfte des Anfangswertes (Abb. 68 -○-). Im Gegensatz dazu stieg das Stromsignal für PNIPAMF in Lösung mit steigender Temperatur um Faktor 6. Oberhalb 32°C bildeten sich unlösliche Polymerpartikel, womit auf eine weitere Steigerung der Temperatur verzichtet wurde (Abb. 68 -■-).<sup>[199]</sup> Der beobachtete Effekt für die sGDH mit dem PNIPAMF ist nicht auf die Steigerung der Enzymaktivität mit steigender Temperatur zurückzuführen. Das Temperaturoptimum der PQQ-GDH liegt bei 25°C. Mit steigender Temperatur auf 40°C ist sogar ein Abfall der Enzymaktivität um ca. 10 % zu verzeichnen.<sup>[200, 201]</sup>

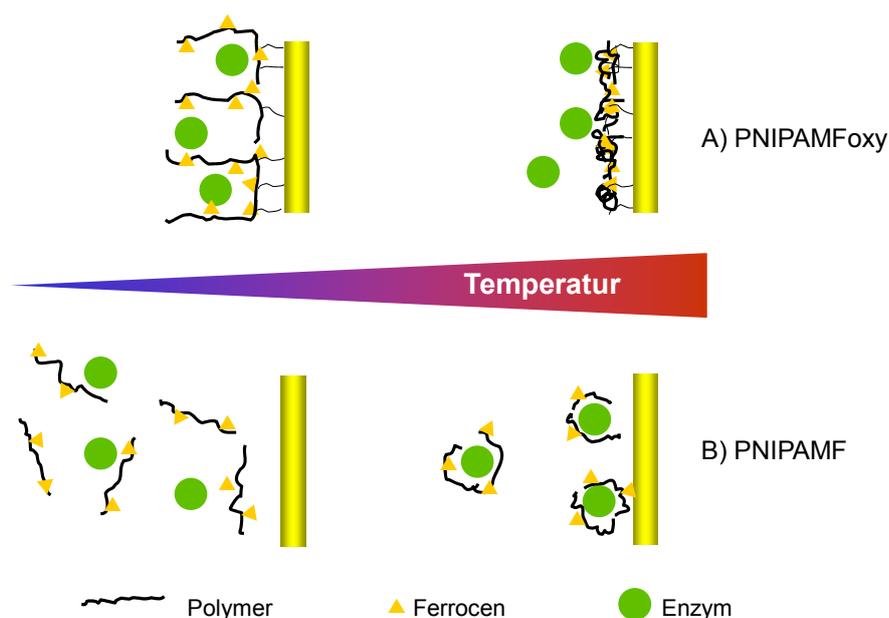


**Abb. 68** Temperaturabhängigkeit des katalytischen Stroms an Gold-PNIPAMFoxy (-○-) und in PNIPAMF-Lösung (5 mg ml<sup>-1</sup> in HBS Puffer) (-■-) mit 10 mM Glucose + 10 nM PQQ-GDH, Potential: + 350 mV; RE: Ag|AgCl; GE: Platin, n = 2

Zur Erklärung der beobachteten Effekte wird ein Modellvorschlag aufgezeigt (Abb. 69). Die Polymerketten des PNIPAMFoxy sind aufgrund der Immobilisierungsmethode nah an der Elektrodenoberfläche und parallel dazu orientiert, einige Ketten stehen büstenähnlich in die Lösung hinein (Abb. 69 A links). Sie bilden flexible, redoxaktive Polymerketten und erlauben somit einen effizienten, heterogenen ET und kurze ET-Wege. Durch Erhöhung der

Temperatur schrumpfen die Polymerketten zusammen und die Bürstenstruktur verschwindet (Abb. 69 A rechts). Aufgrund der steigenden Hydrophobizität wird die Interaktion zwischen Ferrocen und sGDH verringert, damit sinkt das Stromsignal. (Abb. 68). Die Stromsignale mit PNIPAMFoxy-Elektroden lagen bei RT ca. zweifach höher als mit der PNIPAMF-Lösung in vergleichsweise hoher Konzentration ( $5 \text{ mg ml}^{-1}$ ).

Interessanterweise zeigte die Temperaturabhängigkeit des löslichen PNIPAMF genau entgegengesetzte Ergebnisse. Im gequollenen Zustand bildet PNIPAMF relativ lange, lineare Ketten. Diese Ketten bewegen sich wie lösliche Mediatoren in der Pufferlösung. Für einen effizienten ET müssen sich die Enzymmoleküle den Redoxzentren der Polymerketten in richtiger Orientierung annähern (Abb. 69 B links). Bei höheren Temperaturen schrumpfen die Polymerketten. Dadurch können Aggregate aus Polymerketten und Enzymmolekülen entstehen (Abb. 69 B rechts). In diesem Zustand werden die Enzymmoleküle von den Polymerketten umgeben und können mit einer hohen Anzahl an Fc-Einheiten interagieren. Die Effizienz des ET steigt erheblich an, ein höheres Messsignal wird detektiert (Abb. 68).



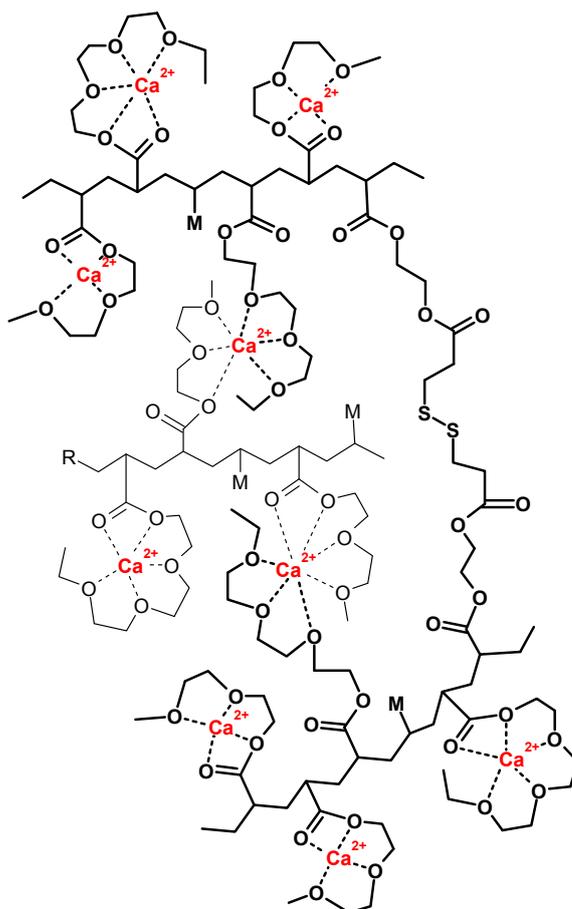
**Abb. 69** Modellvorschlag für den Temperatureffekt von PNIPAMF A) und PNIPAMFoxy-modifizierte Goldelektroden B).

In dieser Arbeit resultierte das Schrumpfen des immobilisierten Polymers in einer Abschirmung der Fc-Einheiten und der Elektrode durch hydrophobe Polymeranteile. Die PQQ-GDH wurde dabei nicht eingeschlossen, der heterogene ET wurde behindert. In der Literatur zeigt ein kovalent immobilisiertes PNIPAM-Häm-Peptid eine Zunahme des Messsignals für den direkten ET mit steigender Temperatur.<sup>[65]</sup> Das bürstenartig angekoppelte PNIPAM-Peroxidase-Modell schrumpft bei höheren Temperaturen und

verkürzt somit den Abstand des Enzyms zur Elektrode, der ET ist verbessert. Die Redox Eigenschaften eines in Lösung befindlichen Phenothiazin-markierten Poly(ethoxyethyletherglycidylethers) lässt sich durch Temperaturerhöhung herabsetzen und damit die thermoschaltbare Elektrokatalyse von Glucoseoxidase erzielen.<sup>[202]</sup>

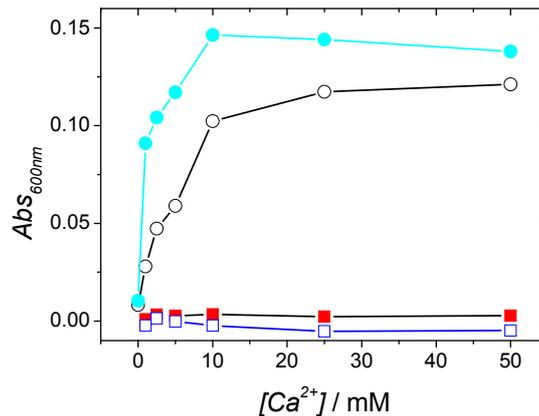
### 3.3.2 PEGMA-Fc-SH und PEGMA-Fc-SS

Poly(ethylenglykole) binden Alkali- und Erdalkalitionen unter Ausbildung Kronenether-ähnlicher Strukturen.<sup>[83-85]</sup> Die PEGMA-Redoxpolymere lassen sich durch die Zugabe dieser Ionen in ihrer Redoxaktivität schalten. Für diese Arbeit wurden Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) exemplarisch für die Untersuchung der Komplexbildungen mit Erdalkalitionen gewählt, da  $\text{Ca}^{2+}$  für die Bildung der aktiven Enzymform der PQQ-GDH eine wichtige Rolle spielen. Es können inter- und intramolekulare Komplexe der PEG-Sauerstoffatome mit den  $\text{Ca}^{2+}$  gebildet werden (Abb. 70).<sup>[83]</sup>



**Abb. 70** Strukturvorschlag für die inter- und intramolekularen Calciumkomplexe für zwei PEGMA-Polymerketten

Die Komplexbildung der Polymere mit  $\text{Ca}^{2+}$  wurde turbidimetrisch (Polymer in Lösung) und amperometrisch (polymermodifizierte Elektroden) bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen untersucht. Der Effekt von  $\text{Ca}^{2+}$  auf die Polymerstruktur sollte charakterisiert werden. Es können nur die PEG-Seitenketten, nicht aber die Thiol- oder Disulfidgruppen das  $\text{Ca}^{2+}$  komplexieren. Disulfid- und Thiollinker tragen keine Ether-Einheiten.



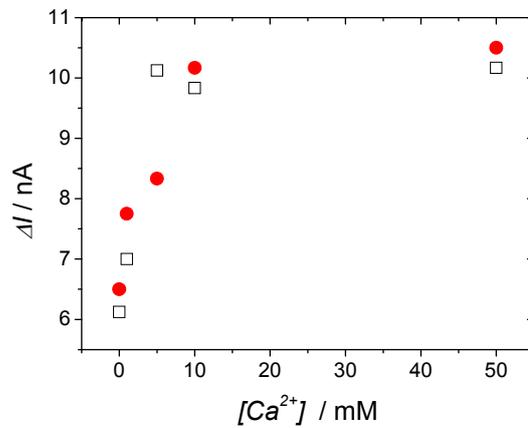
**Abb. 71** Abhängigkeit der Absorption von PEGMA-Fc-SH und PEGMA-Fc-SS von der Calciumkonzentration;  $0.04 \text{ mg ml}^{-1}$  Polymer in Wasser; PEGMA-Fc-SS (-○-), PEGMA-Fc-SH (-■-), PEGMA-Fc-SS + EDTA (-●-), PEGMA-Fc-SH + EDTA (-□-)

Die Absorption für das quervernetzte Polymer stieg mit zunehmender Calciumkonzentration bis ca. 10 mM Calcium (Abb. 71). Der Effekt beruht auf der Verdrängung des Wassers aus den Polymerketten durch die  $\text{Ca}^{2+}$  und der Aggregation der hydrophoben Anteile. Beim Versuch der Umkehr der Komplexbildung mit EDTA stieg die Absorption noch stärker an, anstatt wie erwartet auf 0 zu sinken. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass das EDTA sich zusätzlich an die  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexe anlagert, das  $\text{Ca}^{2+}$  allerdings nicht aus dem Komplex herauslösen kann.

PEGMA-Fc-SS wurde durch die  $\text{Ca}^{2+}$  präzipitiert. Die großen Molekülkomplexe aggregieren durch Ausbildung intra- und intermolekularer Ca-Komplexe, so dass sie ausfallen. PEGMA-Fc-SH hingegen hat kürzere, lineare Polymerketten, die nicht so stark aggregieren. Daher ändert sich sein Absorptionsverhalten nicht. Das lineare Polymer zeigte keine Veränderung der Absorptionsintensität bei Zugabe von Calcium oder EDTA.

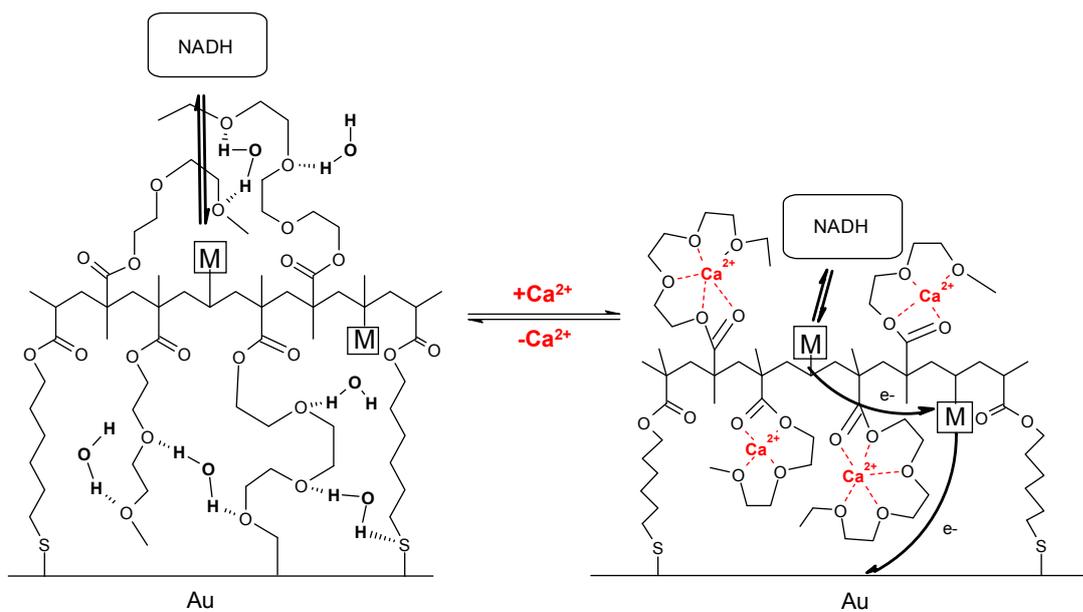
Im Gegensatz zum turbidimetrischen Experiment zeigten beide Polymere im amperometrischen Experiment mit immobilisierten Polymeren ein ähnliches Verhalten (Abb. 72). Es wurde die Oxidation des enzymatisch gebildeten NADH durch polymermodifizierte Elektroden bei steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beobachtet. Durch die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  stieg

der Strom steil an. Die Erhöhung des Messsignals erreichte ein Plateau bei einer Konzentration von ca. 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  NAD-GDH, 100 mM Glucose, 2.5 mM  $\text{NAD}^+$ ).



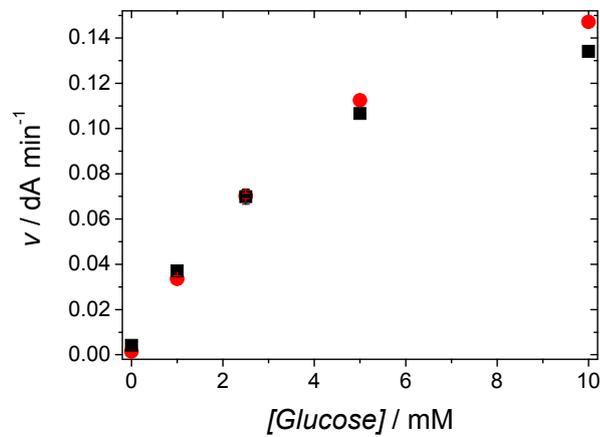
**Abb. 72** Abhängigkeit des Stromes von der Calciumkonzentration mit PEGMA-Fc-SH- (-●-) und PEGMA-Fc-SS- (-□-) modifizierten Goldelektroden in HEPES / KCl pH 8,  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  NAD-GDH + 2.5 mM  $\text{NAD}^+$  + 100 mM Glucose; E = + 400 mV, RE: Ag|AgCl, GE: Platin, n = 2

Durch das Schrumpfen der PEG-Seitenketten wird der ET an den Ketten vorbei erleichtert und damit steigt der Strom (Abb. 73). Bei einer Calciumkonzentration von 10 mM sind alle PEG-Gruppen abgesättigt, eine weitere Steigerung des Signals ist nicht möglich.



**Abb. 73** Modellvorschlag für den Effekt der Calciumionen auf PEGMA-modifizierte Goldelektroden

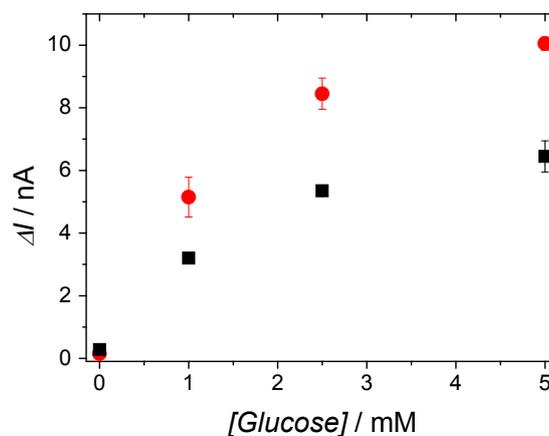
Die Enzymaktivität selbst, zeigte im photometrischen Experiment durch die Zugabe von 10 mM Calciumionen eine geringe Erhöhung der Aktivität um den Faktor 1.1 (Abb. 74).



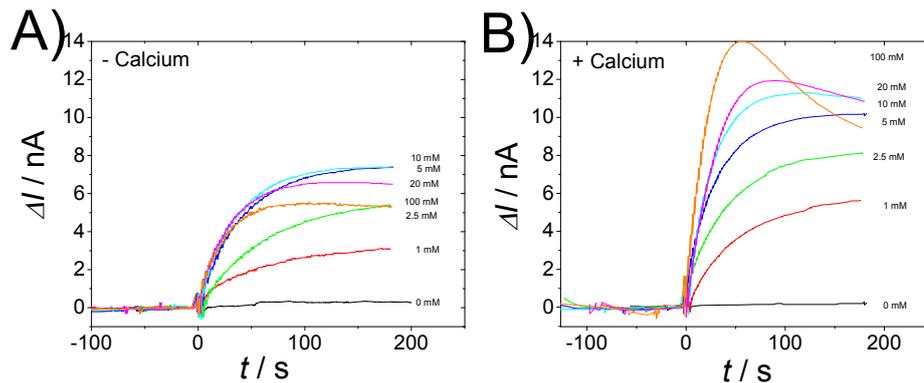
**Abb. 74** Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Glucosekonzentration bei photometrischer Detektion in Abwesenheit (■) und in Anwesenheit (●) von 10 mM Calciumionen; 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  NAD-GDH + 2,5 mM  $\text{NAD}^+$  in HEPES/KCl pH 8, n = 2

Der Calciumeffekt lässt sich, wie der Temperatureffekt beim PNIPAMFoxy, für eine schaltbare Redoxaktivität ausnutzen.

Die Messsignale steigender Glucosekonzentrationen mit einer PEGMA-Fc-SS-modifizierten Goldelektrode ließen sich durch die Zugabe von 10 mM Calciumchlorid um 80 % erhöhen (Abb. 76). Der lineare Bereich für die Glucosekonzentrationen lag zwischen 0 und 2.5 mM Glucose, vergleichbar mit dem linearen Bereich für den optischen Aktivitätstest (Vgl. Abb. 74).



**Abb. 75** Konzentrationsabhängigkeit für Glucose mit PEGMA-Fc-SS-modifizierten Goldelektroden in Abwesenheit (■) und in Anwesenheit (●) von 10 mM Calciumionen; 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  NAD-GDH + 2,5 mM  $\text{NAD}^+$  in HEPES/KCl pH 8; E = + 400 mV, RE: Ag|AgCl, GE: Platin; n = 2

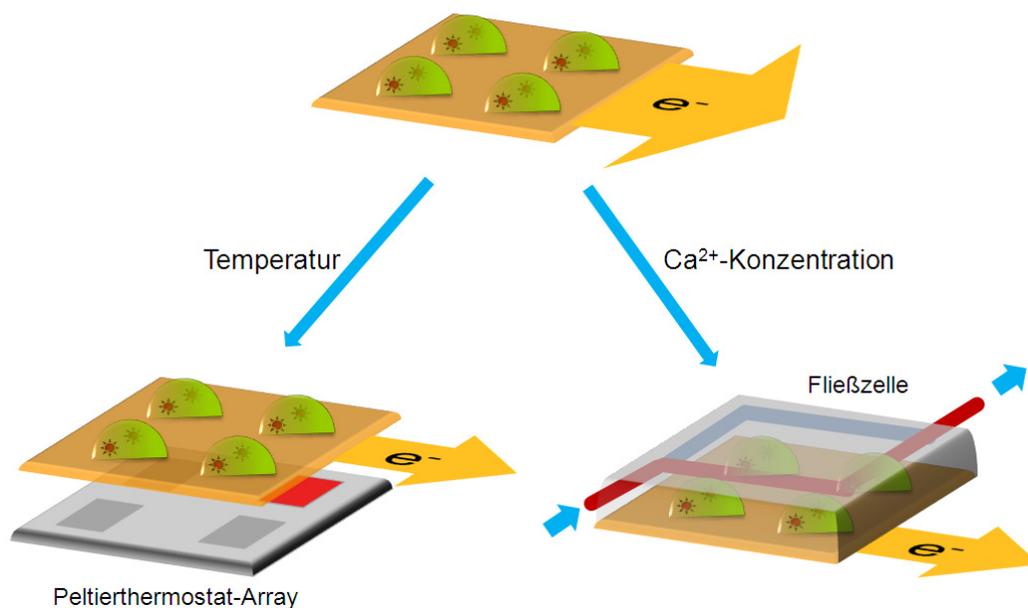


**Abb. 76** Konzentrationsabhängigkeit für Glucose mit PEGMA-Fc-SS-modifizierten Goldelektroden, Originalmesskurven zu Abb. 75 in Abwesenheit (A) und in Anwesenheit (B) von 10 mM Calcium-Ionen;  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  NAD-GDH +  $2,5 \text{ mM NAD}^+$  in HEPES/KCl pH 8,  $E = +400 \text{ mV}$ , RE: Ag|AgCl, GE: Platin

Durch die Verwendung hydrophilerer Oligo(ethylenglykolmethacrylat)-Monomere, d.h. mit längeren PEG-Seitenketten, ließe sich dieser Effekt wahrscheinlich noch verstärken.

Die Temperatur- und Calciumeffekte lassen sich für eine gezielte Steuerung der Polymerstruktur und Permeabilität ausnutzen. Ist keine Redoxaktivität gewünscht, kann das Polymer durch Erhöhung der Umgebungstemperatur auf  $> 30^\circ\text{C}$ , auch lokal an der Elektrode möglich, oder die Verringerung der Calciumkonzentration inaktiviert werden. Dies ist interessant für den Aufbau paralleler Antikörper- und DNA-Arrays mit Markerenzymen. Arrays dieser Art werden sowohl für die Proteinanalytik als auch für die DNA-Expressionsanalyse eingesetzt.<sup>[203, 204]</sup> Dazu werden mikroelektronisch hergestellte Arrays mit einzeln adressierbaren Elektroden eingesetzt. Durch die Verwendung der neuen schaltbaren Redoxpolymere, kann die aufwendige Herstellung entfallen. Eine einzelne, großflächige Elektrode kann, wie auch die Arrays, mit Spots verschiedener Zusammensetzung (AK, DNA-Oligomere o.ä.) versehen werden. Über aufgesetzte, wiederverwendbare Fließkanäle oder über geräteintegrierte Arrays von Peltierthermostaten können die einzelnen Elektrodenbereiche gesondert adressiert werden (Abb. 77). Das Messsignal des aktivierten Spots wird elektrochemisch über die Kontaktierung der gesamten Elektrode erfasst.

Denkbar ist die Anwendung der PEGMA-Polymere für die direkte Messung in Blut, da die Blutproteine von den PEGMA-Schichten abgestoßen werden.



**Abb. 77** Einsatzmöglichkeiten der neuen schaltbaren Redoxpolymere in Enzymmicroarrays

### 3.3.3 Zusammenfassung

Erstmals wurde durch die Variation der Umgebungstemperatur die Kontrolle der Redoxaktivität eines kovalent immobilisierten Redoxpolymers gezeigt. PNIPAMFoxy-modifizierte Goldelektroden zeigten bei einer Temperatur von 20°C ein doppelt so hohes Stromsignal für den Glucoseumsatz mit PQQ-GDH als bei einer Temperatur von 36°C. Die Polymerketten schrumpften bei Temperaturen oberhalb der LCST und die vorherige dreidimensionale Bürstenstruktur verschwand, die Hydrophobizität der Oberfläche stieg dadurch und die Wechselwirkung des Enzyms mit dem Ferrocen war behindert.

Weiterhin wurde erstmals die durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung bedingte Strukturänderung von PEG-Seitenketten für die elektrochemische Analytik ausgenutzt. Die PEGMA-Polymere reagierten auf die Zugabe verschiedener  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen mit Veränderung der Absorptions- und elektrochemischen Eigenschaften. Die Stromwerte für die Oxidation des enzymatisch gebildeten NADH stiegen durch die Zugabe von 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  um 80 %. Diese Beobachtung ist auf ein Schrumpfen der PEG-Seitenketten durch die Ausbildung Kronenether-ähnlicher Strukturen zurückzuführen. Der ET zwischen NADH und den Redoxzentren wird verbessert.



## 4. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Entwicklung und Charakterisierung neuer „smarter“ Redoxhydrogele mit drei verschiedenen funktionellen Eigenschaften und deren Einsatz zur elektrochemischen Kontaktierung mit Oxidoreduktasen beschrieben.

Diese neuen Redoxpolymere tragen

1. kovalent integrierte Redoxzentren umgeben von einer hydrophilen Polymermatrix,
2. reaktive Kopplungsgruppen für den Aufbau selbstassemblierter Polymerschichten auf Elektrodenoberflächen und lassen sich
3. in ihrer Redoxaktivität durch Verwendung responsiver Polymere über externe Stimuli schalten.

Die Redoxhydrogele wurden nach dem Vorbild eines Baukastensystems in einfachen Einstufen-Synthesen synthetisiert. Dazu wurden verschiedene Redoxzentren, reaktive Kopplungsgruppen und Polymermatrices in unterschiedlichen Zusammensetzungen miteinander copolymerisiert.

Die irreversibel integrierten Redoxzentren wurden durch Derivate von Ferrocen (Fc), 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (PD) und 4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenon (CTF) realisiert. Als Voraussetzung für die irreversible Integration via Copolymerisation mussten zunächst polymerisierbare Moleküle der Mediatoren PD und CTF synthetisiert werden. PD wurde über eine Metallkoordinierung (Ruthenium) mit Hilfe eines polymerisierbaren Pyridinlinkers integriert. 4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenon wurde erstmals in dieser Arbeit mit Allylcianoacetat zu dem polymerisierbaren Derivat (4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenylid)allylcianoacetat umgesetzt.

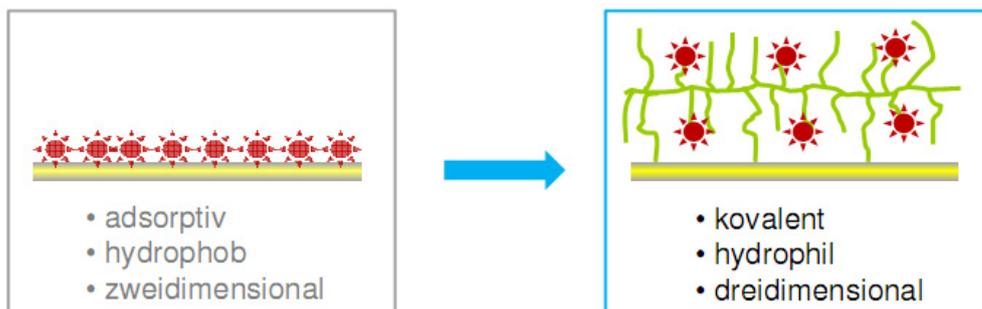
Die kovalente Immobilisierung der Polymere auf Goldelektroden erfolgte mittels copolymerisierter, funktioneller Monomere (Epoxy- (-oxy), Amino- (NH<sub>2</sub>), Thiol- (SH) oder Disulfidfunktionen (SS)). Die polymerisierbaren Thiol- und Disulfidlinker wurden vorab durch einfache Synthesen hergestellt und konnten der direkten Immobilisierung dienen. Die Epoxy- und Aminogruppen der Polymere wurden über externe, funktionelle Thiol- und Disulfidfunktionen auf die Oberflächen gekoppelt. Die Ankopplung hydrophiler Redoxpolymere wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal realisiert.

Die Hydrogele Poly(*N*-Isopropylacrylamid) (PNIPAM) und Poly(ethylenglykolmethacrylat) (PEGMA) dienten als hydrophile Polymergerüste. Es wurden sieben neue Polymere aus den genannten Molekülen synthetisiert: PNIPAMFoxy, PEGMA-Fc-SH, PEGMA-Fc-SS, PNIPAM-RuPD-NH<sub>2</sub>, PEGMA-RuPD-SH, PEGMA-RuPD-SS und PEGMA-CTF-SH. Der Mediator CTF wurde damit erstmals in ein Hydrogel integriert. Die Zusammensetzungen der Polymere unterschieden sich weiterhin durch die zur Polymerisation eingesetzten Monomeranteile und resultierenden Kettenlängen. Der eingesetzte Mediatoranteil in den PNIPAM-Polymeren

beträgt 1.5 % und der eingesetzte Anteil der Kopplungsgruppen 21 %. In den PEGMA-Polymeren wurden sowohl 14.5 % Mediator- als auch Kopplungsgruppenmonomere eingesetzt. Die Hydrogele zeigten eine Verteilung der Molekulargewichte von 1 bis 36 kD.

Die Integration der Mediatoren und die kovalenten Ankopplungen per Selbstassemblierung auf Goldelektroden wurden physiko- und elektrochemisch bestätigt. Die Redoxpotentiale der verschiedenen Polymere für die unterschiedlichen Redoxzentren, lagen im Bereich von 0 bis + 400 mV (Ag|AgCl). Es wurden Geschwindigkeitskonstanten für den heterogenen Elektronentransfer von 20 bis 80 s<sup>-1</sup> ermittelt, die Ferrocen-Polymere zeigten dabei den effizientesten ET.

Diese Hydrogele wurden in Form von dünnen Polymerfilmen auf Elektrodenoberflächen aufgebracht. Durch die erstmals gezeigte, derartige Ankopplung der Polymere, unabhängig von der Kopplungsgruppe, entstehen dreidimensionale, hydrophile Polymerschichten. Sie bilden eine Kombination aus bisher eingesetzten Mediatormonoschichten und Redoxpolymeren (Abb. 78). Die Elektronentransferwege sind kurz und der Elektronentransfer daher effizient.



**Abb. 78** Vergleichende Abbildungen zweidimensionaler und dreidimensionaler Elektrodenmodifizierungen, rot: Mediator, grün: Redoxhydrogel

Diese polymermodifizierten Elektroden wurden für die Kontaktierung von zwei exemplarisch ausgewählten Oxidoreduktasen eingesetzt. Beide Enzyme unterscheiden sich in ihren Katalysemechanismen insofern, dass die Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-abhängige Glucosedehydrogenase (NAD-GDH) ein frei bewegliches Coenzym und die Pyrrolochinolinchinon-abhängige Glucosedehydrogenase (PQQ-GDH) ein prosthetisches Coenzym verwenden. Die geeignete Polymerzusammensetzung für die Interaktion mit den Enzymen wurde ermittelt. Die beiden PNIPAM-Polymere, mit Ferrocen und PD als Mediator, ergaben die höchsten Katalysefaktoren (katalytischer Strom/diffusiver Strom) für PQQ-GDH. Aufgrund der kurzen Elektronentransferwege waren die höheren Mediatoranteile in den PEGMA-Polymeren nicht notwendig für effizientere Elektronentransferprozesse. Für die NAD-GDH wurden für vier von sieben Polymeren fast identische, Katalysefaktoren von 1.2 -

1.3 erhalten. Das frei bewegliche Coenzym NAD transportiert die Elektronen zwischen Redoxzentren und Enzym. Der Elektronentransfer in der Polymermatrix spielte dabei keine Rolle. Die PEGMA-Polymere ergaben auch für die PQQ-GDH keine höheren Katalysefaktoren. Diese Polymere können die für die PQQ-GDH essentiellen Calciumionen binden und damit zu deren Inaktivität beitragen. Die Abstoßungskräfte der PEG-Seitenketten auf Biomoleküle konnten durch die Copolymerisationen mit weiteren Monomeren nicht verkleinert werden.

Das PNIPAMFoxy wurde in Verbindung mit der PQQ-GDH für den Aufbau eines kompetitiven Immunoassays eingesetzt. Das in Lösung befindliche Enzym ließ sich mit einer erstmals erreichten Empfindlichkeit von 0.5 nM nachweisen, das daraus hergestellte Konjugat ergab eine Nachweisgrenze von 5 nM.

Die Redoxaktivitäten der PNIPAMFoxy- und PEGMA-Fc-Polymere ließen sich durch externe Stimuli in Form von Temperatur und Calciumkonzentrationen kontrollieren. Erstmals wurden die responsiven Eigenschaften der Polymermatrices für die Schaltung des Oxidationsvermögens von irreversibel fixierten Redoxpolymeren eingesetzt. Das Stromsignal für den Glucoseumsatz durch PQQ-GDH wurde durch die Erhöhung der Temperatur von 20 auf 36°C um die Hälfte verringert. Dieser Effekt wurde in einem vorgeschlagenen Modell erklärt. Das Redoxsignal für die Oxidation des enzymatisch gebildeten NADH an PEGMA-Fc-Polymeren wurde durch die Zugabe von 10 mM Calciumionen gesteigert. Die Empfindlichkeit der modifizierten Elektroden für die Detektion unterschiedlicher Glucosekonzentrationen konnte so um 80 % gesteigert werden. Ein Modell für die Komplexierung der Calciumionen durch die PEG-Seitenketten unter Ausbildung Kronenether-ähnlicher Strukturen und der daraus resultierenden Steigerung des Elektronentransfers wurde vorgeschlagen.



## 5. Ausblick

Die aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die geeignete Polymerzusammensetzung und Mediatormoleküle der Hydrogele können für den Aufbau weiter optimierter Redoxpolymere eingesetzt werden.

Es wurde deutlich, dass PNIPAM das besser geeignete Hydrogel darstellte. Die Temperaturkontrolle der Redoxaktivität ließe sich durch die Einführung hydrophiler oder hydrophober Gruppen genauer einstellen. Ein Mediatoranteil von 1.5 % war ausreichend für einen effizienten Elektronentransfer.

Zur Ausnutzung des Calciumeffektes können die PEGMA-Polymere ebenfalls optimiert werden. Längere PEG-Seitenketten führen ebenfalls zu hydrophileren Polymeren, die für die Kontaktierung der Oxidoreduktasen besser geeignet wären. Außerdem können auch sie für eine Temperaturkontrolle eingesetzt werden.

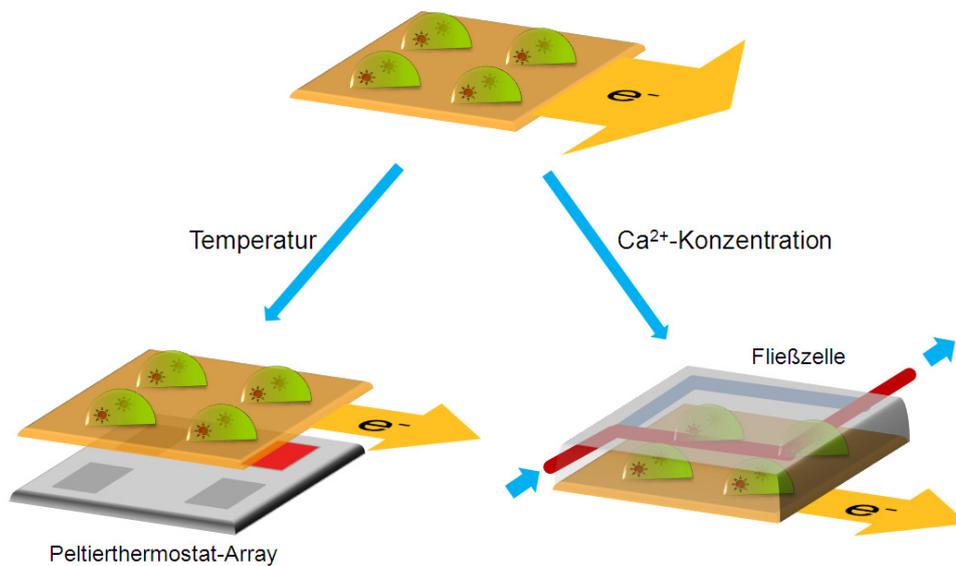
Außerdem kann die Copolymerisation von CTF in längere Polymerketten gelingen, indem zunächst das Allylcianoacetat copolymerisiert wird und erst anschließend die Knoevenagel-Kondensation mit 4-Carboxy-2,5,7-trinitro-9-fluorenon durchgeführt wird. So wird die Inhibition der Polymerisation durch die Nitrogruppen verhindert.

Die Ankopplungsgruppen für den Aufbau selbstassemblierter Schichten können für die Ankopplung von Enzymen oder Proteinen eingesetzt werden. Die Modifizierung mit den Epoxy- und Amino-funktionalisierten Polymeren könnte beschleunigt werden, indem die funktionellen Gruppen vorab mit den externen Thiol- und Disulfidgruppen umgesetzt werden. Weiterhin stehen diese Gruppen für die Modifizierung anderer Elektrodenoberflächen als Gold zur Verfügung. So können sie z.B. an funktionalisierte Silane gekoppelt werden, welche auf Indiumzinnoxid-, Kohlenstoffpaste- oder Platinelektroden immobilisiert sind. Aufgrund der anderen Elektrodenmaterialien könnten z.B. die PEGMA-RuPD-Polymere zu effizienten Elektrokatalysen eingesetzt werden.

Die polymermodifizierten Elektroden können für eine Vielzahl an Enzymen und damit Analyten eingesetzt werden. Die NAD-GDH und PQQ-GDH wurden exemplarisch für die NAD- und PQQ-abhängigen Enzyme eingesetzt. Eine Übertragung auf weitere Enzyme sollte problemlos möglich sein.

Der Einsatz der polymermodifizierten Elektroden für Immunoassays oder -sensoren kann durch einen optimierten Messaufbau erfolgen. Durch Miniaturisierung der Elektroden können Verdünnungsschritte vermieden werden. Eine Änderung des Messprinzips in die direkte Konkurrenz von markiertem und unmarkiertem Analyten, anstelle der beschriebenen Konkurrenz um die Analytbindungsstellen eines markierten Antikörpers, könnte ebenfalls eine Verbesserung der Assayempfindlichkeit führen.

Die schaltbaren Redoxaktivitäten der Polymere können für den Aufbau von Enzymmicroarrays eingesetzt werden (Abb. 79). Sie könnten die aufwendige Herstellung von Elektrodenarrays einzeln ansprechbarer Elektroden ersetzen. Die Polymere könnten auf einen Goldchip gespottet werden. Die einzeln ansprechbaren Spots werden durch die Temperaturregelung unterhalb des Chips, z.B. durch einen wiederverwendbaren Array aus Peltierthermostaten im Probenhalter, erreicht. Sie könnten aber auch durch den Aufsatz von Mikrofluidikzellen mit unterschiedlichen Fließkanälen, einzeln ansprechbare Fließkanäle bilden.



**Abb. 79** Einsatzmöglichkeit der neuen schaltbaren Redoxpolymere in Enzymmicroarrays

## 6. Material und Methoden

### 6.1 Material

“Perfect Block”	MoBiTec
1,10-Phenanthrolin-5,6-dion	Aldrich
1-Brombutan	Fluka
1-Brombutanol	Fluka
2,2'-Azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril)	Wako
2,6-Dichloroindophenol	Fluka
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Tris Base)	Sigma
2-Hydroxyethylmethacrylat	Fluka
2-Methylacryloylchlorid	Fluka
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB-ready-to-use-Lösung)	Sigma
3,3'-Dithiodipropionsäure	Fluka
3,3'-Dithiopropionsäure-di( <i>N</i> -hydroxysuccinimidylester)	Fluka
4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma
4-Iodobutylacetat 85%	Aldrich
4-Pyridinpropanol	Aldrich
Acrylamid/Bisacrylamid (30:1)	Sigma
Allylamin	Fluka
Ammoniumpersulfat	Fluka
Anti-Fluorescein-Antikörper Peroxidase markiert (Anti-FITC-POD)	Rockland
Calcium(II)chloriddihydrat	Merck
Cysteamin	Fluka
Dichloro-Ruthenium-Triphenanthrolinhydrat [(RuP <sub>3</sub> )Cl <sub>2</sub> ]	Aldrich
Diethylenglykoldimethylmethacrylat	Aldrich
Dimethylformamid	Fluka
Dioxan	Fluka
Ethanol 96%	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
FreeZyme™-Conjugation Purification Kit	Pierce
Glycerin	AppliChem
Glycin	Merck
Kaliumchlorid (99,99%)	Sigma
Kaliumhydroxid	Roth
Lithiumchlorid	Aldrich
Magermilchpulver	AppliChem
Methacrylsäure-2,3-epoxypropylester	Fluka
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma
NAD-abhängige Glucosedehydrogenase (NAD-GDH)	Fluka
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
<i>N</i> -Isopropylacrylamid	Aldrich
<i>N</i> -Succinimidyl- <i>S</i> -Acetylthiopropionat (SATP)	Pierce
Perchlorsäure 70%	Merck
<i>p</i> -Nitrophenylphosphat (pNPP)	Gerbu
Poly(ethylenglykolsorbitanmonolaurat) (Tween 20)	Sigma
PQQ-abhängige Glucosedehydrogenase (PQQ-GDH, sGDH)	Roche
Pyrrlochinolinchinon (PQQ)	Fluka
Roti®-Quant (Proteinbestimmung nach Bradford)	Roth
Ruthenium(III)chlorid	Fluka
Sulfosuccinimidyl-4- <i>[N</i> -maleimidomethyl]-cyclohexan-1-carboxylat (Sulfo-SMCC)	Pierce
Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat	Aldrich
Tetrahydrofuran	Fluka
Trichlormethan	Riedel-de-Haen

Triethylenglykolethermethacrylat	Aldrich
Tris(2-carboxyethyl)phosphin-hydrochlorid (TCEP HCl)	Pierce
Vinylferrocen	Alfa Aesar
$\beta$ -Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid (NAD)	Gerbu
$\beta$ -Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid reduziert (NADH)	Gerbu

## 6.2 Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bemerkung
HBS-Puffer	20 mM HEPES, 20 mM KCl und 1 mM CaCl <sub>2</sub> in Wasser	pH-Wert-Einstellung mit 2 M Kaliumhydroxid (KOH) auf 7,5 bzw. 8
HEPES / KCl-Puffer	20 mM HEPES und 20 mM KCl in Wasser	pH-Wert-Einstellung mit 2 M KOH auf 7.5 bzw. 8
KCl-Lösung	3 M KCl in Wasser	
PBS-Puffer	1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl in Wasser	pH-Wert 7.4
PBS / EDTA-Lösung	PBS-Puffer + 5 mM EDTA	
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	1M CaCl <sub>2</sub> in Wasser	
EDTA	0.5 M EDTA in Wasser	
KCl/HCl / Pepsin-Lösung	0.1 M KCl in Wasser + 2 mg ml <sup>-1</sup> Pepsin	pH-Wert wird mit 0.1 M HCl auf 2.1 2 mg ml <sup>-1</sup> Pepsin werden jeden Tag frisch zugegeben
Hydroxylamin-HCl-Lösung	0.5 M Hydroxylamin + 25 mM EDTA in PBS	
TBS-Puffer	Fertig geliefert im FreeZyme™ Conjugation Purification Kit	

## 6.3 Methoden

**Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC):** Analytische und präparative HPLC-Trennungen wurden mit einem SHIMADZU-HPLC-System (Pumpe: LC-20AT, Degasser: DGU-20A3, Kommunikationsmodul: CBM-20A) an einer MZ-Aqua Perfect C 18 Säule (Säulengröße: 250 x 4.6 mm (analytisch) bzw. 250 x 20 mm (präparativ); Korngröße: 5  $\mu$ m) der Firma MZ-Analytik (Deutschland) als stationärer Phase unter Verwendung eines UV / Vis-Detektors (SPD-10A VP, SHIMADZU, Deutschland) durchgeführt. Für die Aufreinigung von CTFM und des Allycyano-CTF wurde eine RP 18 Säule der Firma MZ Analytik (Säulengröße: 600 x 7.8 mm; Korngröße: 5  $\mu$ m; Porengröße: 500 Å) als stationäre

Phase verwendet. Die mobilen Phasen sind in den jeweiligen Syntheseabschnitten angegeben.

**Gelpermeationschromatographie (GPC):** Die Bestimmung der Molekulargewichte von PNIPAMFoxy und PNIPAMF wurde mit einem Thermo Separation Products-GPC-System (Thermo Fisher Scientific Deutschland, Dreieich) an GRAM-Säulen (Polymer Standard Service GmbH (PSS), Mainz, Deutschland) (Partikelgröße: 7  $\mu\text{m}$ ; Porengröße: 100 und 1000  $\text{\AA}$ , Säulengröße: 300 mm x 8 mm) durchgeführt. Eine Lösung aus Methylpyrrolidon und 0.5 wt% Lithiumbromid (LiBr) diente als Eluent. Die Flussrate betrug 0.5 ml  $\text{min}^{-1}$ . Die Detektion erfolgte bei Raumtemperatur durch die Bestimmung des Brechungsindex bzw. UV / Vis-Absorption bei 300 nm in Poly(styrol)äquivalenten.

Die Bestimmung der Molekulargewichte der anderen Polymere erfolgte mit einem Spectra-System-GPC-System (Thermo Fisher Scientific Deutschland, Dreieich) an GRAM-Säulen (Polymer Standard Service GmbH (PSS), Mainz, Deutschland) (Korngröße: 10  $\mu\text{m}$ ; Säulengröße: 300 mm x 7.5 mm) als stationäre Phase. Die Trennung erfolgte mit dem Eluenten DMSO + 0.5 g  $\text{l}^{-1}$  LiBr bei einer Flussrate von 1 ml  $\text{min}^{-1}$ . Die Detektion erfolgte bei Raumtemperatur mit einem Brechungsindexdetektor und mittels UV / Vis-Absorptionsmessung bei 300 nm. Dabei diente Poly(methylmethacrylat) als Standardsubstanz.

**Dünnschichtchromatographie:** Es wurden *Kieselgel 60* beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) und Konzentrierungszone der Firma Merck verwendet (DC-Fertigplatten, Kieselgel 60  $\text{F}_{254}$ , Schichtdicke 0.2 mm, Merck).

**Säulenchromatographie:** Die präparative Säulenchromatographie wurde in selbstgefüllten Schwerkraftsäulen verschiedener Größe an *Kieselgel 60* (Merck, Deutschland; Korngröße: 0.063-0.02 mm) als stationärer Phase vor der Polymerisation durchgeführt. Trichlormethan ( $\text{CHCl}_3$ ) diente als mobile Phase. Die gewünschten Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie (Laufmittel:  $\text{CHCl}_3$ ) ermittelt.

Die Aufreinigung der RuPD-Polymere erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie in selbstgefüllten Schwerkraftsäulen an SX-3-Beads von BioRad. Die Säule wurde mit Toluol, einem Toluol- $\text{CHCl}_3$ -Gemisch (1:1) und letztendlich mit  $\text{CHCl}_3$  gespült. Die Elution erfolgte mit  $\text{CHCl}_3$ . Die gewünschte Fraktion wurde anhand der Farbe, der Absorption und des elektrochemischen Verhaltens bestimmt.

**Kern-Magnet-Resonanzspektrometrie (NMR):** Es wurden  $^1\text{H}$ -Spektren (256 Scans) oder  $^{13}\text{C}$ -Spektren (256 Scans) in deuteriertem Methanol, Trichlormethan oder DMSO mit einem Avance 300 Spektrometer (Bruker Franzen Analytik, Bremen) aufgezeichnet. Die chemischen Verschiebungen (in ppm) wurden in bezug auf das angegebene deuterierte Lösungsmittel bzw. das undeuterierte Restlösungsmittel ermittelt.

**Massenspektrometrie:** Die Massenspektren wurden mit einer GC-MS SSQ 710 (Finnigan, Thermo Scientific Deutschland, Dreieich) unter Elektronenionisierung bzw. einem MALDI-TOF REFLEX II (Bruker Franzen Analytik, Bremen) aufgenommen. Als Probenmatrix diente eine 5 % Lösung aus 2', 4', 6'-Trihydroxyacetophenonenmonohydrat (THAP) in Methanol.

**Kontaktwinkelmessungen:** Mit einem BOC Auto 500 Sputtering System (Edwards Limited, Großbritannien) wurden goldbeschichtete Deckgläser hergestellt. Die mit Hellmanix-Lösung vorgereinigten Deckgläser wurden mit einer ersten 10 nm-starken Chromschicht und einer zweiten 100 nm-starken Goldschicht beschichtet. Bis zu ihrer Verwendung wurden sie in Ethanol gelagert.

Die Kontaktwinkel der polymermodifizierten Golddeckgläser (Modifizierung analog zur Elektrodenmodifizierung Kap. 6.4.2) wurden mit einem videogesteuerten optischen Kontaktwinkelmessgerät (OCA 20; Data Physics Instruments GmbH, Bad Vilbel, Deutschland) unter Verwendung von Reinstwasser bestimmt. Es wurden Zehnfachbestimmungen durchgeführt.

**Temperatur-abhängige Messungen:** Die turbidimetrischen Messungen der PNIPAM-Polymere in Wasser bei verschiedenen Temperaturen wurden bei einer Wellenlänge von 600 bzw. 750 nm mit einem JASCO V-570 Spektrophotometer (JASCO, Groß-Umstadt, Deutschland) mit temperierbarer Messzelle in Halbmikroküvetten (Schichtdicke: 1 cm) durchgeführt. Die Temperierung erfolgte über einen Peltier-Thermostaten.

Die amperometrischen Messungen von PNIPAMFoxy und PNIPAMF bei verschiedenen Temperaturen wurden mit einer temperierbaren Glasmesszelle im Dreielektrodensystem wie unter Kap. 6.4.4 beschrieben, durchgeführt. Die Temperaturen wurden über einen Bereich von ca. 20 bis 60°C variiert.

**Einfluss der Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ):** Der Einfluß der  $\text{Ca}^{2+}$  auf die PEG-Polymere wurde photometrisch und amperometrisch bei variierenden Calciumkonzentrationen untersucht. Die photometrischen Messungen wurden bei einer Wellenlänge von 600 nm und 0.04 mg / ml Polymer in Wasser und die amperometrischen wie unter Kap. 6.4.4 beschrieben, bei gleichbleibenden Enzym- und Substratmengen, durchgeführt.

**UV/Vis-Absorptionsmessungen:** Die Absorptionsspektren wurden mit einem JASCO V-570 Spektrophotometer in Halbmikroküvetten im Bereich von 300 – 800 nm gegen Luft (PMMA; Schichtdicke 1 cm; Carl Roth GmbH + Co KG, Deutschland) aufgezeichnet. Die Polymere wurden in Wasser bzw. Ethanol gelöst eingesetzt.

Die Enzymaktivitäten wurden wie unter Kap. 6.6.2 beschrieben, bei 340 nm bzw. 600 nm spektroskopisch ermittelt.

## 6.4 Elektrochemische Messungen

### 6.4.1 Elektrodenvorbereitung

**Polieren mit Aluminiumpasten:** Die Diskelektroden wurden mit Pasten aus Aluminiumoxidpulver (Korngröße: 0.1, 0.3, 0.05  $\mu\text{m}$ ) für je 5 min auf einer Polierunterlage poliert. Zwischendurch wurden die Elektroden mit Wasser abgespült. Am Ende wurden sie im Ultraschallbad für 10 min behandelt. Zusätzlich konnten sie mittels Cyclischer Voltammetrie im Dreielektrodensystem in 1 M Schwefelsäure und folgenden Einstellungen gereinigt werden: von -1.5 V bis +1.8 V, 0.5 V  $\text{s}^{-1}$ , 50 Scans.

### 6.4.2 Elektrodenmodifizierung

Die Elektroden wurden je 12 h in der Polymerlösung (1 mg  $\text{ml}^{-1}$  in EtOH) inkubiert. Für die SH-Polymere wurden zusätzlich 5 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphinhydrochlorid (TCEP HCl) als Reduzierungsreagenz zugegeben. Im Falle von **12** wurden die Elektroden zunächst 12 h in 10 mM Cysteamin und anschließend 12 h in PNIPAMFoxy (0,5 mg  $\text{ml}^{-1}$  in Wasser) inkubiert. Für **24** wurde eine 10 mM Lösung von Dithiodipropionsäure-di(*N*-Hydroxysuccinimidylester) in DMF als externe Thiolverbindung verwendet. Vor dem Gebrauch wurden die Elektroden mit dem jeweiligen Messpuffer abgespült.

**33** wurde in Tetrahydrofuran gelöst und für 10 min an Gold- bzw. Glaskohlenstoffelektroden adsorbiert. Anschließend wurde die Elektrode mit dem Messpuffer abgespült.

### 6.4.3 Cyclische Voltammetrie und Square-Wave-Voltammetrie

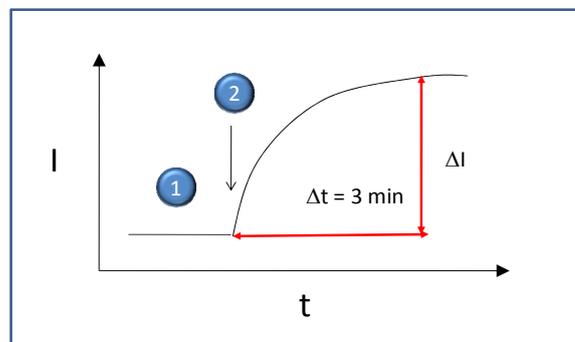
Die voltammetrischen Messungen wurden mit einem Autolab PGSTAT 30 System (Eco Chemie B.V., Utrecht, Niederlande) und der GPES Analysesoftware (General Purpose Electrochemical System Version 4.9) durchgeführt. Die Messungen wurden im Dreielektrodensystem mit einer (modifizierten) Arbeitselektrode (AE; Gold), einer Referenzelektrode (RE; Ag|AgCl|3 M KCl) und einer Gegenelektrode (GE; Platin) in einer 1-ml-Messzelle im angegebenen Puffer, durchgeführt. Die verwendeten Vorschubgeschwindigkeiten (Scanraten (SR)) werden jeweils angegeben.

Die Geschwindigkeitskonstante für den heterogenen Elektronentransfer  $k_s$  wurden nach der Methode von Laviron aus der Peakseparation ermittelt.<sup>[181]</sup>

### 6.4.4 Amperometrie

Amperometrische Messungen wurden mit einem Potentiostaten Pulsed Electrochemical Detector (Biometra, Göttingen, Deutschland) im Dreielektrodensystem (modifizierte AE, RE (Ag|AgCl| 3M KCl), GE (Pt)) in einer 1-ml-Messzelle in HEPES/KCl- oder HBS-Puffer bei pH

7.5 oder 8 durchgeführt. Die verwendeten Potentiale werden jeweils angegeben. Während der Messungen wurde die Lösung gerührt. Es wird die Stromzunahme nach Enzym- und Substratzugabe ermittelt. Die entsprechenden Konzentrationen werden jeweils aufgeführt.



**Abb. 80** Typischer Kurvenverlauf einer amperometrischen Messkurve, ❶ Hintergrundsignal, ❷ Enzym- und Substratzugabe

Die Auswertung des Signals erfolgte wie in Abb. 80 dargestellt. 3 min nach Enzym- und Substratzugabe wurde die Stromdifferenz ( $\Delta I$ ) zwischen Hintergrundsignal (❶) und resultierendem Stromsignal (❷) ermittelt.

## 6.5 Polymersynthesen

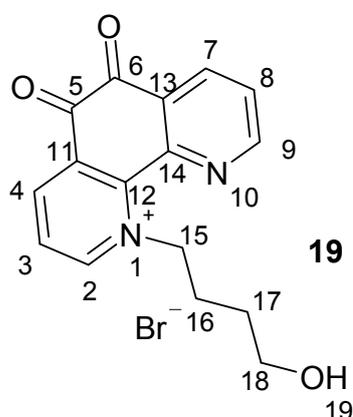
### 6.5.1 Monomere

#### **Synthese von 1-(4-Hydroxybutyl)-1,2-dihydro-1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (19)**

Die Synthese von 1-(4-Hydroxybutyl)-1,2-dihydro-1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (**19**) wurde modifiziert nach Hilt *et al.*<sup>[127]</sup> durchgeführt. 500 mg (2.375 mmol) 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (**17**) und 189 mg (1.187 mmol) Brombutanol (**18**) wurden in 50 ml Acetonitril gelöst und unter Stickstoffatmosphäre und Ausschluss von Licht sieben Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Bildung eines gelben Niederschlags konnte beobachtet werden. Die Reaktionskontrolle erfolgte mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie und HPLC (Laufmittel: 90 % Methanol / 10 % Wasser). Das gelbe Präzipitat wurde abfiltriert, in Methanol aufgenommen und mittels HPLC aufgereinigt. Neben dem PD wurden zwei weitere Fraktionen erhalten. Die Charakterisierung der beiden Fraktionen mittels  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR und Massenspektrometrie führten zu keinem zufriedenstellenden, eindeutigen Ergebnis.

Weitere Synthesen mit Brombutan wurden, analog zur beschriebene Synthese, zur Aufklärung der Syntheseprodukte durchgeführt. 100 mg (476  $\mu\text{mol}$ ) 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion und 65.2 mg (51  $\mu\text{l}$ ; 476  $\mu\text{mol}$ ) Brombutan (**20**) wurden in 100 ml trockenem Acetonitril

24 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels HPLC (90 % Methanol/10 % Wasser) verfolgt.



$C_{16}H_{15}N_2O_3$ : 283.3 g mol<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 8.8 – 7.4 ppm (m, Ar CH-2 bis CH-4 und CH-7 bis CH-9); 4.3 ppm (s, CH<sub>2</sub>-15); 3.2 – 2.9 ppm (m, CH<sub>2</sub>-18, OH-19); 1.55 ppm (m, CH<sub>2</sub>-17); 1.3 ppm (m, CH<sub>2</sub>-16).

<sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) Fraktion 1:  $\delta$  = 181.5, 170.8, 160.6, 156.1, 153.1, 149.2, 143.8, 131.2, 128.6, 122.3, 89.0, 77.0, 69.9, 39.3, 23.2 ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) Fraktion 2:  $\delta$  = 163.5, 141.3, 138.4, 134.8, 130.5, 126.7, 121.7, 117.3, 94.9, 84.5, 77.0, 54.0, 37.3, 19.8 ppm.

MS ESI (m/z) Fraktion 1: 287 [M+4]; 356 [M-Butanol], 465 [Dimer 2PD-1Butanol, -1OH], 508 [Dimer 2PD-2Butanol, -2OH].

MS ESI (m/z) Fraktion 2: 287 [M+4], 551 [Dimer 2PD-2Butanol, -1OH + Na], 565 [2(M)]

### Synthese von [Ru(PD)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>-Komplex (22)

1.4 g (5,35 mmol) RuCl<sub>3</sub>·3 H<sub>2</sub>O (**21**) wurden in 50 ml *N,N*-Dimethylformamid (DMF) gelöst. Zu der Lösung wurden 1.5 g (35,4 mmol) LiCl zugegeben und das Gemisch unter Rückfluss und Stickstoffatmosphäre zum Sieden erhitzt. Eine Lösung von 4.5 g (10.7 mmol) 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (**17**) in 50 ml DMF wurde innerhalb 1 h langsam der ersten Lösung zugetropft. Nach dem Abschluss der Zugabe wurde das Reaktionsgemisch weitere 8 h bei 185 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wurden 400 ml Aceton und 100 ml Diethylether zugegeben und die Mischung für 24 h bei -18 °C gelagert. Das präzipitierte Produkt wurde abfiltriert und vakuumgetrocknet. Die Ausbeute betrug 58 %. Die Aufreinigung erfolgte mittels präparativer HPLC (MZ-Aqua Perfect; Laufmittel: 90 % Wasser / 10 % Methanol). Der Komplex wurde mittels Massenspektrometrie bestätigt.

MS (m/z): 592 [M]; 615 [M + Na<sup>+</sup>]

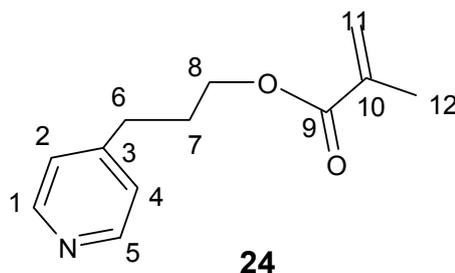
**Synthese von 3-(Pyridin-4-yl)propylmethacrylat (Ligand) (24)**

Eine Mischung aus 10 g (72.9 mmol) 4-Pyridinpropanol (**23**) und 10 g (100 mmol, 13.77 ml) Triethylamin wurde auf 0°C temperiert. Dazu wurde eine Lösung von 8.36 g (80 mmol) Methacrylsäurechlorid (**4**) in 40 ml Dichlormethan (DCM) tropfenweise zugesetzt. Nach dem vollständigen Zutropfen der Lösung wurde das Reaktionsgemisch 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Produkt mehrere Male mit Wasser gewaschen und vakuumgetrocknet. Die Ausbeute betrug 20 %. Vor der Polymerisation wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel 60, CHCl<sub>3</sub>). Die neue Verbindung, 3-(Pyridin-4-yl)propylmethacrylat (**24**), wurde mittels <sup>1</sup>H-NMR und Massenspektrometrie charakterisiert.

C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>: 205.26 g mol<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.6 ppm (d, CH-1 und CH-4); 7.24 ppm (d, CH-2 und CH-5); 6.18 ppm (d, CH<sub>2</sub>-11); 5.67 ppm (d, CH<sub>2</sub>-11); 4.28 ppm (m, CH<sub>2</sub>-8); 2.82 ppm (m, CH<sub>2</sub>-6); 2.14 ppm (m, CH<sub>2</sub>-7); 2.04 ppm (s, CH<sub>3</sub>-12).

MS (m/z): 205 [M]; 206 [M + H<sup>+</sup>]

**Synthese von 6-(Pyridin-2-yl-disulfanyl)hexylmethacrylat (Thiollinker) (5)**

5 g (22.7 mmol) 2,2'-Dithiopyridin (**1**) wurden in 50 ml Methanol, versetzt mit 333 µl Eisessig, gelöst. Dazu wurden 1.5 ml (1.47 g, 11 mmol) 6-Mercapto-1-hexanol (**2**), gelöst in 4 ml Methanol wurden langsam dazugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei RT gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch (Kieselgel 60, Dichlormethan) verfolgt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Trichlormethan) gereinigt und das Lösungsmittel abdestilliert. Das Produkt (**3**) wurde in 50 ml Dichlormethan versetzt mit 8 ml Triethylamin gelöst und diese Mischung auf 0°C abgekühlt. Anschließend wurden 1.12 ml (1.2 g, 11.5 mmol) Methacrylsäurechlorid (**4**) in 20 ml Dichlormethan gelöst und der ersten Lösung langsam tropfenweise zugesetzt. Die Mischung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 24 h gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Produkt mehrmals mit gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde vom Lösungsmittel befreit und säulenchromatographisch über Kieselgel 60 mit Petrolether / Ethylacetat 1:1 als Eluent aufgereinigt. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels wurde ein farbloses Öl (**5**) mit 58 % Ausbeute erhalten. Die Charakterisierung erfolgte mittels <sup>1</sup>H-NMR.



**Synthese von 4-Carboxy-2,5,7-Trifluorenon (33)**

Eine Lösung aus 130 ml rauchender Salpetersäure und 80 ml konzentrierter Schwefelsäure wurden unter Rückfluss erhitzt (85°C). Eine rote Lösung aus 10 g Fluorenon-4-carboxylsäure (**32**) in 80 ml konzentrierter Schwefelsäure wurde innerhalb von 10 min dazugetropft. Zu dieser Lösung wurde eine weitere Lösung aus 90 ml rauchender Salpetersäure und 110 ml konzentrierter Schwefelsäure über 4.5 h zugetropft. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz 12 h gerührt. Anschließend wurde er auf 1.5 l Eiswasser gegossen. Dabei wurde ein leicht gelbes Präzipitat (**33**) erhalten und gewaschen. Nach dem Waschen mit 5 %iger wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und Wasser, wurde **33** vakuumgetrocknet. Die Ausbeute betrug 50 %. Die Substanz wurde mittels Massenspektrometrie charakterisiert.

C<sub>14</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>: 359.21 g mol<sup>-1</sup>

MS (m/z): 359 [M]; 358 [M-H]

**Synthese von (4-Carboxy-2,5,7-Trifluorenyliden)malononitril (CTFM) (35)**

0.5 g (1.4 mmol) **33** wurden in 50 ml trockenem Methanol gelöst. Dazu wurden 0.2 g (3 mmol) Malononitril (**34**) und 3 µl Piperidin gegeben. Nach 4 h Erhitzen unter Rückfluss wurde die Lösung auf die Hälfte aufkonzentriert und über Nacht bei 4°C gelagert. Anschließend wurde der abfiltrierte Feststoff getrocknet. Das Produkt (**35**) wurde mittels HPLC (5 % Methanol / 95 % Wasser) analog zur Literatur aufgereinigt<sup>[148]</sup>. Dabei wurde eine Ausbeute von 61 % erreicht. Die blaue Substanz wurde mit Massenspektrometrie bestätigt.

C<sub>17</sub>H<sub>5</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>: 407.26 g mol<sup>-1</sup>

MS (m/z): 430 [M + Na<sup>+</sup>]; 446 [M + K<sup>+</sup>]

**Synthese von (4-Carboxy-2,5,7-Trifluorenyliden)allylcianoacetat (CTF-Allyl) (37)**

Die Synthese von **37** wurde analog zu der von **35** durchgeführt. Anstelle des Malononitrils wurden 0.375 g (3 mmol) Allylcianoacetat (**36**) eingesetzt. Das violette Produkt wurde mittels HPLC (5 % Methanol / 95 % Wasser) aufgereinigt und massenspektrometrisch bestätigt.

C<sub>20</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>: 466.32 g mol<sup>-1</sup>

MS (m/z): 489 [M + Na<sup>+</sup>]; 505 [M + K<sup>+</sup>]

**6.5.2 PNIPAM-Polymersynthesen****PNIPAMFoxy (12)**

294 mg (2.6 mmol) **9**, 10 mg (47 µmol) **10** und 96 µl (705 µmol) Methacrylsäure-2,3-Epoxypropylester (**11**) wurden in 1 ml entgastem Dioxan gelöst. Diese Lösung wurde 5 min mit Stickstoff begast. Die radikalische Polymerisation wurde durch Zugabe von 13.5 mg

(0.08 mmol) AIBN gestartet und anschließend 24 h bei 70°C weitergeführt. Nach dem Abkühlen wurde die Polymerlösung mit 20 ml Diethylether präzipitiert und anschließend gewaschen. Nach dem Vakuumtrocknen des Niederschlages wurde ein gelbes Pulver (**12**) von 87 %iger Ausbeute erhalten.

#### **PNIPAMF (12a)**

370 mg (3.3 mmol) *N*-Isopropylacrylamid (NIPAM) (**9**) und 10 mg (47 µmol) Vinylferrocen (**10**) wurden in 1 ml entgastem Dioxan gelöst. Die radikalische Polymerisation unter Argonatmosphäre wurde durch die Zugabe von 16 mg (0.1 mmol) AIBN gestartet und anschließend 24 h bei 70°C weitergeführt. Nach dem Abkühlen wurde die Polymerlösung mit 20 ml Diethylether präzipitiert und anschließend gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein gelbes Pulver (**12a**) in 92 %iger Ausbeute erhalten.

#### **PNIPAM-RuPD-NH<sub>2</sub> (27)**

2.735 g (24.2 mmol) **9**, 84 mg (440 µmol) **24** und 376 mg (6.6 mmol = 494 µl) Allylamin (**25**) wurden in 8 ml Tetrahydrofuran (THF) gelöst und mit Hilfe eines Eisbades gekühlt. Die radikalische Polymerisation unter Argonatmosphäre wurde durch Zugabe von 128 mg (4 wt%) 2,2'-Azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) gestartet und 12 h bei 40°C fortgeführt. Dabei wurde eine leicht viskose Lösung mit hellgelber Farbe erhalten. Zur Aufarbeitung wurde das Polymer (**26**) unter starkem Rühren in 20 ml Diethylether gegeben und anschließend mehrmals mit Diethylether gewaschen. Das getrocknete Polymer war ein weißes, feines Pulver in 72 %iger Ausbeute. Nach dem Umsatz mit **22** (Kap. 6.5.4) wurde eine rot-braune Suspension erhalten, das daraus erhaltene **27** wurde mit Diethylether präzipitiert. Es wurde mittels Sephadex G-25 und Wasser als mobiler Phase aufgereinigt. Nach dem Trocknen wurde eine rotbraune Substanz in einer Ausbeute von 60 % erhalten.

### **6.5.3 PEGMA-Polymersynthesen**

#### **PEGMA-Fc-SH (15)**

319 mg (1.3 mmol = 325 µl) Triethylenglykolmonoethylethermethacrylat (**13**), 244 mg (1.3 mmol = 249 µl) Diethylenglykolmethylethermethacrylat (**14**), 110 mg (520 µmol) **10** und 163 mg (520 µmol) **5** wurden in 3 ml THF gelöst und mit Hilfe eines Eisbades gekühlt. Die radikalische Polymerisation unter Argonatmosphäre wurde durch Zugabe von 33 mg 2,2'-Azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) gestartet und wurde 12 h bei 40°C weitergeführt. Zur Aufarbeitung wurden 20 ml Petrolether zum Polymer (**15**) gegeben. Ein Teil des Polymers ging in Lösung, der unlösliche Teil sammelte sich an der Kolbenwand. Der

Petrolether-lösliche Teil wurde verworfen und der -unlösliche Teil bildete das Produkt. Das getrocknete Polymer war ein orange-gelbes Öl. Die Ausbeute betrug 87 %.

#### **PEGMA-Fc-SS (16)**

**16** wurde analog zu **15** synthetisiert. Anstelle von **5** wurden 225 mg (520  $\mu\text{mol}$ ) **8** eingesetzt. Das getrocknete Polymer (**16**) ist ein harzartiger orangefarbener Feststoff. Die Ausbeute betrug 89 %.

#### **PEGMA-RuPD-SH (30)**

**30** wurde analog zu **15** synthetisiert. Statt Vinylferrocen wurden 50 mg (260  $\mu\text{mol}$ ) 3-(Pyridin-4-yl)propylmethacrylat eingesetzt. Das getrocknete Produkt (76 % Ausbeute) wurde mit dem  $[\text{Ru}(\text{PD})_2]^{2+}$ -Komplex umgesetzt. Nach der säulenchromatographischen Aufreinigung (SX-3 Beads; Trichlormethan) wurde ein orangebraunes Gel in einer Ausbeute von 56 % erhalten.

#### **PEGMA-RuPD-SS (31)**

**31** wurde analog zu **16** synthetisiert. Anstelle des Vinylferrocens wurden 96 mg (520  $\mu\text{mol}$ ) 3-(Pyridin-4-yl)propylmethacrylat eingesetzt. Nach dem Umsatz des getrockneten Polymergerüsts (**29**) mit dem  $[\text{Ru}(\text{PD})_2]^{2+}$ -Komplex und säulenchromatographischer Aufreinigung (SX-3 Beads; Trichlormethan) wurde ein orangebraunes Gel (**31**) in 51 %iger Ausbeute erhalten.

#### **PEGMA-CTF-SH (38)**

132 mg (538  $\mu\text{mol}$  = 135  $\mu\text{l}$ ) Triethylglykolmonoethylethermethacrylat (**13**), 101 mg (538  $\mu\text{mol}$  = 103  $\mu\text{l}$ ) Diethylglykolmethylethermethacrylat (**14**), 67 mg (215  $\mu\text{mol}$ ) 6-(Pyridin-2-yl-disulfanyl)hexylmethacrylat (**5**) und 100 mg (215  $\mu\text{mol}$ ) (4-Carboxy-2,5,7-Trifluorenyliden)allylcyanoacetat (**37**) wurden in 1 ml Methanol gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde mit Hilfe eines Eisbades gekühlt. Die Polymerisation unter Argonatmosphäre wurde durch Zugabe von 27 mg 2,2'-Azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) gestartet und 12 h bei 40°C fortgeführt. Das rote, schwach-viskose Polymer (**38**) wurde vom Lösungsmittel befreit und anschließend säulenchromatographisch (SX-3-Beads; Trichlormethan) gereinigt. Es wurden sechs unterschiedlich gefärbte Fraktionen gesammelt. Die roten Fraktionen (3-6) wurden vereint und das Lösungsmittel entfernt. Die Ausbeute betrug 85 %.

#### 6.5.4 Umsetzung der Ligand-Polymere mit dem RuPD-Komplex

Die Umsetzung der Polymergerüste mit Ruthenium-bis-(1,10-Phenanthrolin-5,6-dion)-dichlorid erfolgte bei vermindertem Lichteinfluss. Eine Lösung aus 500 mg des synthetisierten Polymergerüsts und 120 mg des unaufgereinigten Komplex-Gemisches in 100 ml Ethanol wurde unter Rückfluss und Argonatmosphäre 12 h bei 78°C gerührt. Die Aufreinigung erfolgt säulenchromatographisch (Kieselgel 60; Trichlormethan).

### 6.6 Enzymatische Methoden

#### 6.6.1 Rekonstituierung der PQQ-GDH

Die Pyrrolochinolinchinon-abhängigen Glucose-dehydrogenase (PQQ-GDH) benötigt für ihre Funktionalität das Coenzym PQQ. Vor dem Einsatz einer neuen Enzymlösung muss diese mit PQQ rekonstituiert werden. 50 µM PQQ wurden der Apoenzym-Lösung in HBS pH 7.5 zugegeben und das Gemisch 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Anschließend war das Enzym einsatzbereit. Es kann max. 1 Woche bei 4°C gelagert werden.

#### 6.6.2 Enzymaktivität

**NAD-GDH:** 40 µl 50 mM β-Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-Lösung und 100 µl 1 M Glucoselösung wurden zu 835 µl HBS-Puffer pH 8 gegeben. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 25 µl 0.05 mg ml<sup>-1</sup> Enzymlösung gestartet. Die Absorptionzunahme durch die Entstehung von reduziertem β-Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid (NADH) wurde mit einem JASCO V-570 Spektrophotometer bei λ = 340 nm über 90 s bei 25°C verfolgt. Aus dem erhaltenen Graphen wurde die Absorptionsänderung pro Minute ermittelt. Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach Gleichung (15)

$$\text{Aktivität [U / mg]} = \frac{\Delta A / \text{min} \cdot V_{\text{ges}}}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot c}, \quad (15)$$

mit der Absorptionsänderung pro Minute  $\Delta A / \text{min}$ , dem Gesamtvolumen  $V_{\text{ges}}$ , dem Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$ , der Schichtdicke  $d$ , dem Volumen der zugegebenen Enzymlösung  $v$  und ihrer Konzentration  $c$ .

**PQQ-GDH:** Zunächst wurde eine Konzentrationsreihe von Dichlorophenolindophenol (DCIP) in HBS-Puffer pH 7.5 versetzt mit 20 mM Glucose (HBS-G) im Bereich von 2.5 – 40 µM bei λ = 600 nm mit einem JASCO V-570 Spektrophotometer bei 25°C aufgenommen, die für die Berechnung der Aktivität herangezogen wurde. Die Enzymaktivität der PQQ-GDH wurde durch die Zugabe von 10 µl 0.1 mg ml<sup>-1</sup> PQQ-GDH zu 990 µl 40 µM DCIP in HBS-G gestartet. Die Absorptionsabnahme wurde 90 s bei λ = 600 nm und 25°C verfolgt. Der

resultierende Graph lieferte den Betrag der Absorptionsänderung pro Minute. Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach Gleichung (15):

Die Aktivität der Antikörper-Enzym-Konjugate (Anti-FITC-sGDH) wurde analog zu dem Enzym bestimmt.

### 6.6.3 Elektrochemische Bestimmungen

Wenn nicht anders beschrieben, wurden für die elektrochemischen Enzymbestimmungen mit NAD-GDH 2.5 mM  $\beta$ -NAD, 100 mM Glucose und 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  NAD-GDH verwendet.

Für die PQQ-GDH-Bestimmungen wurden 5 mM Glucose und 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  PQQ-GDH eingesetzt.

## 6.7 Immunologische Methoden

### 6.7.1 Enzym-Antikörper-Konjugation

*N-Succinimidyl S-Acetylthiopropionat (SATP) und Sulfosuccinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexan-1-carboxylat (sulfo-SMCC)*

500  $\mu\text{l}$  Enzymlösung ( $\sim 60 \mu\text{M}$  in PBS-Puffer) wurden mit 5  $\mu\text{l}$  SATP-Lösung (55 mM in PBS-Puffer) 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend über eine NAP-5 Säule (General Electrics, Deutschland) gereinigt und fraktioniert gesammelt. Über eine Proteinbestimmung mittels Roti<sup>®</sup>-Quant (s.u.) wurden die proteinhaltigen Fraktionen bestimmt und vereint. Zur Aktivierung der Sulfhydrylgruppen wurde eine Deacetylierung mittels 50 mM Hydroxylamin-HCl für 2 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Es erfolgt eine Reinigung mittels NAP-5-Säule und der gleichzeitigen Umpufferung zu PBS/5 mM EDTA. In der Zwischenzeit wurden 1 ml Antikörper (AK; hier Anti-FITC, 1  $\text{mg ml}^{-1}$  in PBS-Puffer) mit 40  $\mu\text{l}$  sulfo-SMCC (11 mM in PBS/5 mM EDTA) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Mischung wurde über eine NAP-5-Säule gereinigt und in PBS/EDTA eluiert. Über eine Proteinbestimmung mittels Roti<sup>®</sup>-Quant wurden die proteinhaltigen Fraktionen bestimmt und vereint.

Zur Konjugation wurden AK-Lösung und Enzym-SATP-Lösung im molaren Verhältnis von ca. 1 : 5 zusammen gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt.

Zur Entfernung des EDTA aus der Lösung erfolgte eine Umpufferung mittels PD-10-Säule zu TBS-Puffer. Anschließend wurde das Konjugat mit dem FreeZyme<sup>®</sup> Conjugation Purification Kit (Pierce, s.u.) von ungebundenem Enzym befreit. Über eine Proteinbestimmung mittels Roti<sup>®</sup>-Quant wurden die proteinhaltigen Fraktionen bestimmt. Das Anti-FITC-sGDH-Konjugat musste mit PQQ rekonstituiert werden, um ein gebrauchsfertiges Konjugat zu erhalten.

*FreeZyme™ Conjugation Purification Kit*

Die Aufreinigung der Anti-FITC-sGDH-Konjugate erfolgte mit einer Nickel-Iminodiessigsäure-Säule (Ni-IDA). Die Aufreinigung basiert darauf, dass Histidinreiche Bereiche im Fc-Teil des AK das Nickel komplexieren <sup>[195]</sup>. Überschüssiges Enzym verlässt die Säule ungebunden. Das Konjugat wurde mit EDTA-haltigem Puffer eluiert. Nach einer Aufreinigung über eine Poly(acrylamid)-Entsalzungssäule wurde für die gesammelten Fraktionen eine Proteinbestimmung durchgeführt. Die positiv getesteten Fraktionen wurden vereint.

*Roti®-Quant (Proteinbestimmung nach Bradford)*

Die Roti®-Quant-Arbeitslösung wurde aus 2 Teilen Roti®-Quant (Coomassie Brilliant Blue - G250) und 5.5 Teilen Wasser hergestellt. Je 200 µl Arbeitslösung wurden in ein Well einer Mikrotiterplatte gegeben, 50 µl Standard (Rinderserumalbumin BSA) bzw. Probe wurden dazugegeben. Nach 5 min bei RT wurde die Absorption bei  $\lambda = 590$  nm bestimmt.

**6.7.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Acrylamid/Bisacrylamid:	30 % (29:0,2)
Ammoniumpersulfat:	10 %
Sodiumdodecylsulfat:	10 %
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin):	fertige Lösung

**Tabelle 5** Zusammensetzung der SDS-PAGE-Puffer

Probenpuffer	Laufpuffer	Trenngelpuffer	Sammelgelpuffer
3.55 ml Wasser	3 g Tris Base	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
1.25 ml Sammelgelpuffer	14 g Glycin	18.15 g Tris Base	6 g Tris Base
2.5 ml Glycerin	1 g SDS	80 ml Wasser	60 ml Wasser
2.0 ml 10% (w/v) SDS	pH 8.3	pH 8.8 mit 6 N HCl einstellen	pH 6.8 mit 6 N HCl einstellen
0.2 ml 0.5 % (w/v) Bromphenolblau		auf 100 ml auffüllen, bei 4°C lagern	auf 100 ml auffüllen, bei 4°C lagern

**Tabelle 6** Zusammensetzung verschiedener SDS-Gele

Je 2 Gele	4 %	10 %
Wasser	3,05 ml	4,1 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	650 µl	3,3 ml
Sammel- oder Trenngelpuffer	1,25 ml	2,5 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl
10 % APS	25 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Die Gele wurden entsprechend Tabelle 6 hergestellt. Die Proben wurden im Probenpuffer mindestens 1:2 verdünnt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese wurde bei 100-200 V in Laufpuffer für ca. 30 min – 1h durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie-Farbstoff angefärbt. Ein mitgeführter Standard / Marker (SM1841, Fermentas) ließ eine Aussage über die Größe der Proteine zu. Zum anderen ließ sich aus dem Bild der SDS-PAGE eine Aussage über die Reinheit der Proteinlösung treffen.

### 6.7.3 ELISA

Zur Optimierung der Testbedingungen, wie FITC-BSA-, Uraninmenge und Blockpuffer, wurde ein Anti-FITC-POD-Konjugat verwendet. Als Blockierungspuffer wurden 3 % BSA / PBS, 1 % Magermilchpulver und 3 % „Perfect Block“ getestet.

Testablauf in der Mikrotiterplatte (*Angaben je Well*)

1. 100 µl FITC-BSA in PBS 1 h RT
2. 3x Waschen mit 300 µl PBS
3. 200 µl Blockierungslösung 2 h RT
4. 3x Waschen mit 300 µl PBS / 0.05 % Tween 20
5. a) **Sandwich-Test:** 100µl Anti-FITC-POD-Konjugat (1:20.000 in Blockpuffer) 1 h RT  
oder  
b) **kompetitiver Test:** 50 µl Uranin in Blockpuffer + 50µl Anti-FITC-POD-Konjugat 1:10.000 in Blockpuffer 1 h RT
6. 3x Waschen mit 300 µl PBS / 0.05 % Tween 20
7. 100 µl TMB-ready-to-use-Lösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)
8. Abstoppen mit 50 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
9. Absorption bei  $\lambda = 450$  nm messen

Der Immunoassay mit elektrochemischer Detektion wurde bis zu Punkt 5b) in ähnlicher Weise durchgeführt, jedoch wurde anstelle von Anti-FITC-POD Anti-FITC-sGDH zugegeben. Die 100 µl-Überstände aus Punkt 5 wurden für die Messung entnommen und in die mit 895 µl HBS pH 7.5 gefüllte Messzelle überführt. Die Stromzunahme durch Zugabe von Substrat (5 mM Glucose) wurde amperometrisch mit der PNIPAMFoxy-Elektrode bei + 400 mV detektiert

## 7. Literatur

- [1] Duden, *Fremdwörterbuch*, Duden, **1990**.
- [2] P. Ball, *Nanotechnology* **2002**, 13, R15.
- [3] BMBF, in *Glossar von A-Z*, **2009**.
- [4] BIOKON, **2009**.
- [5] D. Thévenot, R., Toth, K., Durst, R., Wilson, G., S., *Pure and Applied Chemistry* **1999**, 71, 2333.
- [6] K. Habermuller, M. Mosbach, W. Schuhmann, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **2000**, 366, 560.
- [7] D. Nelson, Cox, M., *Lehninger Biochemie*, Vol. 3, Springer Verlag, **2001**.
- [8] G. Steinberg-Yfrach, Liddell, P. A., Hung, S.-C., Moore, A.L., Gust, D., Moore, T.A., *Nature* **1997**, 385, 239.
- [9] M. Katterle, V. I. Prokhorenko, A. R. Holzwarth, A. Jesorka, *Chemical Physics Letters* **2007**, 447, 284.
- [10] V. Coman, C. Vaz-Dominguez, R. Ludwig, W. Herreither, D. Haltrich, A. L. De Lacey, T. Ruzgas, L. Gorton, S. Shleev, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2008**, 10, 6093.
- [11] S. Tsujimura, A. Wadano, K. Kano, T. Ikeda, *Enzyme and Microbial Technology* **2001**, 29, 225.
- [12] C. E. Reimers, L. M. Tender, S. Fertig, W. Wang, *Environmental Science & Technology* **2001**, 35, 192.
- [13] I. Karube, T. Matsunaga, S. Mitsuda, S. Suzuki, *Biotechnology and Bioengineering* **1977**, 19, 1535.
- [14] G. T. R. Palmore, H. Bertschy, S. H. Bergens, G. M. Whitesides, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1998**, 443, 155.
- [15] G. T. R. Palmore, H. H. Kim, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1999**, 464, 110.
- [16] T. Chen, S. C. Barton, G. Binyamin, Z. Q. Gao, Y. C. Zhang, H. H. Kim, A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, 8630.
- [17] S. C. Barton, H. H. Kim, G. Binyamin, Y. C. Zhang, A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, 5802.
- [18] S. C. Barton, J. Gallaway, P. Atanassov, *Chemical Reviews* **2004**, 104, 4867.

- [19] A. Heller, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, 6, 209.
- [20] J. Wang, *Chemical Reviews* **2008**, 108, 814.
- [21] U. Wollenberger, A. Drungiliene, W. Stocklein, J. J. Kulys, F. W. Scheller, *Analytica Chimica Acta* **1996**, 329, 231.
- [22] W. H. Mullen, S. J. Churchouse, P. M. Vadgama, *Analyst* **1985**, 110, 925.
- [23] E. J. Dcosta, I. J. Higgins, A. P. F. Turner, *Biosensors* **1986**, 2, 71.
- [24] E. Ryabova, S., Goral, V. N., Csöregi, E., Mattiasson, B., Ryabov, A., D., *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, 38, 804.
- [25] W. Schuhmann, Ohara, T., J., Schmidt, H.-L., Heller, A., *Journal of the American Chemical Society* **1991**, 113, 1394.
- [26] N. Mano, Kuhn, A., *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1999**, 477, 79.
- [27] S. E. Creager, G. K. Rowe, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1997**, 420, 291.
- [28] Y. Motoyama, Nakamura, N., Ohno, H., *Electroanalysis* **2008**, 20, 923.
- [29] W. J. Zhang, G. X. Li, *Analytical Sciences* **2004**, 20, 603.
- [30] J. Rubio-Retama, J. Hernando, B. Lopez-Ruiz, A. Hartl, D. Steinmuller, M. Stutzmann, E. Lopez-Cabarcos, J. A. Garrido, *Langmuir* **2006**, 22, 5837.
- [31] B. Nagel, Warsinke, A., *Analytical Letters* **2006**, 39, 2507.
- [32] P. Skladal, *Electroanalysis* **1997**, 9, 737.
- [33] A. Warsinke, A. Benkert, F. W. Scheller, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **2000**, 366, 622.
- [34] D. Stollner, W. Stocklein, F. Scheller, A. Warsinke, *Analytica Chimica Acta* **2002**, 470, 111.
- [35] R. A. Marcus, *Angewandte Chemie-International Edition* **1993**, 32, 1111.
- [36] A. Oubrie, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, A. J. J. Olsthoorn, J. A. Duine, B. W. Dijkstra, *Embo Journal* **1999**, 18, 5187.
- [37] J. A. Duine, J. A. Jongejan, *Annual Review of Biochemistry* **1989**, 58, 403.
- [38] K. Matsushita, Shinagawa, E., Adachi, O., Ameyama, M., *Biochemistry* **1989**, 28, 6276.
- [39] V. Laurinavicius, J. Razumiene, A. Ramanavicius, A. D. Ryabov, *Biosensors & Bioelectronics* **2004**, 20, 1217.
- [40] K. Habermuller, S. Reiter, H. Buck, T. Meier, J. Staepels, W. Schuhmann, *Microchimica Acta* **2003**, 143, 113.
- [41] H. Zheng, Zhou, J., Zhang, J., Huang, R., Jia, H., Suye, S., *Microchimica Acta* **2009**, 165, 109.

- [42] D. Schomburg, *Vol. 2008*, Technische Universität Braunschweig, Institut für Biochemie und Bioinformatik, **2008**.
- [43] K. Yamamoto, G. Kurisu, M. Kusunoki, S. Tabata, I. Urabe, S. Osaki, *Journal of Biochemistry* **2001**, *129*, 303.
- [44] L. Gorton, Domínguez, *Reviews in Molecular Biotechnology* **2002**, *82*, 371.
- [45] K. Y. Lee, S. H. Yuk, *Progress in Polymer Science* **2007**, *32*, 669.
- [46] N. A. Peppas, J. Z. Hilt, A. Khademhosseini, R. Langer, *Advanced Materials* **2006**, *18*, 1345.
- [47] E. Gil, S. Hudson, *Progress in Polymer Science* **2004**, *29*, 1173.
- [48] F. Mao, N. Mano, A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 4951.
- [49] J. Chen, Y. Pei, L. M. Yang, L. L. Shi, H. J. Luo, *Macromolecular Symposia* **2005**, *225*, 103.
- [50] C. K. Chee, S. Rimmer, D. A. Shaw, I. Soutar, L. Swanson, *Macromolecules* **2001**, *34*, 7544.
- [51] Y. K. Jhon, R. R. Bhat, C. Jeong, O. J. Rojas, I. Szleifer, J. Genzer, *Macromolecular Rapid Communications* **2006**, *27*, 697.
- [52] Y. J. Zhang, S. Furryk, D. E. Bergbreiter, P. S. Cremer, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 14505.
- [53] K. Van Durme, H. Rahier, B. Van Mele, *Macromolecules* **2005**, *38*, 10155.
- [54] K. Sumaru, K. Ohi, T. Takagi, T. Kanamori, T. Shinbo, *Langmuir* **2006**, *22*, 4353.
- [55] D. Matsukuma, K. Yamamoto, T. Aoyagi, *Langmuir* **2006**, *22*, 5911.
- [56] A. Baldi, M. Lei, Y. D. Gu, R. A. Siegel, B. Ziaie, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2006**, *114*, 9.
- [57] Q. Fu, G. Rao, T. Ward, Y. Lu, G. Lopez, *Langmuir* **2007**, *23*, 170.
- [58] W. Song, F. Xia, Y. Bai, F. Liu, T. Sun, L. Jiang, *Langmuir* **2007**, *33*, 327.
- [59] I. Lokuge, X. Wang, P. Bohn, *Langmuir* **2007**, *23*, 305.
- [60] L. Ionov, M. Stamm, S. Diez, *Nano Letters* **2006**, *6*, 1982.
- [61] M. Markström, Lizana, L., Orwar, O., Jesorka, A., *Langmuir* **2008**, *24*, 5166.
- [62] W. F. Lee, Y. H. Lin, *Journal of Materials Science* **2006**, *41*, 7333.
- [63] T. Ito, T. Yamaguchi, *Langmuir* **2006**, *22*, 3945.
- [64] M. Malmsten, *Soft Matter* **2006**, *2*, 760.
- [65] K. Komori, K. Takada, T. Tatsuma, *Langmuir* **2006**, *22*, 478.
- [66] Y. Li, N. He, X. Wang, W. Chang, Y. Ci, *Analyst* **1998**, *123*, 359.

- [67] Y. X. Sun, J. T. Zhang, S. W. Huang, S. F. Wang, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2007**, *124*, 494.
- [68] D. Suzuki, H. Kawaguchi, *Colloid and Polymer Science* **2006**, *284*, 1443.
- [69] T. Tatsuma, K. Takada, H. Matsui, N. Oyama, *Macromolecules* **1994**, *27*, 6687.
- [70] T. Tatsuma, K. Saito, N. Oyama, *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1994**, 1853.
- [71] J. Bunsow, D. Johannsmann, *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, *326*, 61.
- [72] O. Ernst, A. Lieske, M. Jager, A. Lankenau, C. Duschl, *Lab on a Chip* **2007**, *7*, 1322.
- [73] O. Ernst, A. Lieske, A. Hollander, A. Lankenau, C. Duschl, *Langmuir* **2008**, *24*, 10259.
- [74] K. Nakajima, S. Honda, Y. Nakamura, F. Lopez-Redondo, S. Kohsaka, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, *Biomaterials* **2001**, *22*, 1213.
- [75] M. A. Nandkumar, M. Yamato, A. Kushida, C. Konno, M. Hirose, A. Kikuchi, T. Okano, *Biomaterials* **2002**, *23*, 1121.
- [76] A. Richter, S. Howitz, D. Kuckling, K. Kretschmer, K. F. Arndt, *Macromolecular Symposia* **2004**, *210*, 447.
- [77] A. Richter, S. Howitz, D. Kuckling, K. F. Arndt, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2004**, *99*, 451.
- [78] K. Uhlig, E. Wischenhoff, A. Lankenau, H. G. Börner, A. Laschewsky, C. Duschl, J.-F. Lutz, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*.
- [79] J. F. Lutz, A. Hoth, *Macromolecules* **2006**, *39*, 893.
- [80] J. F. Lutz, O. Akdemir, A. Hoth, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 13046.
- [81] J. F. Lutz, K. Weichenhan, O. Akdemir, A. Hoth, *Macromolecules* **2007**, *40*, 2503.
- [82] S. I. Yamamoto, J. Pietrasik, K. Matyjaszewski, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2008**, *46*, 194.
- [83] E. Bekturov, Tolendina, A., Shaikhutdinov, Y., Dzhumadilov, T., *Polymer of Advanced Technologies* **1993**, *4*, 564.
- [84] K. Ito, T. Hirokawa, *Journal of Chromatography A* **1996**, *742*, 281.
- [85] R. Sartori, L. Sepulveda, F. Quina, E. Lissi, E. Abuin, *Macromolecules* **1990**, *23*, 3878.
- [86] R. Hoss, F. Vogtle, *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1994**, *33*, 375.
- [87] M. J. Marsella, H. D. Maynard, R. H. Grubbs, *Angewandte Chemie-International Edition* **1997**, *36*, 1101.

- [88] E. Riedel, *Anorganische Chemie, Vol. 4*, Walter de Gruyter GmbH & CoKG, Berlin, **1999**.
- [89] H. Yang, Zhu, H., Zhu, H., Xie, B., Zhao, Y., Chen, Y., Wang, D., *Polymer* **2007**, *48*, 4344.
- [90] J. Razumiene, R. Meskys, V. Gureviciene, V. Laurinavicius, M. D. Reshetova, A. D. Ryabov, *Electrochemistry Communications* **2000**, *2*, 307.
- [91] J. Razumiene, A. Vilkanauskyte, V. Gureviciene, V. Laurinavicius, N. V. Roznyatovskaya, Y. V. Ageeva, M. D. Reshetova, A. D. Ryabov, *Journal of Organometallic Chemistry* **2003**, *668*, 83.
- [92] A. D. Ryabov, V. S. Kurova, V. N. Goral, M. D. Reshetova, J. Razumiene, R. Simkus, V. Laurinavicius, *Chemistry of Materials* **1999**, *11*, 600.
- [93] G. Wittstock, H. Emons, W. R. Heineman, *Electroanalysis* **1996**, *8*, 143.
- [94] B. Persson, H. S. Lee, L. Gorton, T. Skotheim, P. Bartlett, *Electroanalysis* **1995**, *7*, 935.
- [95] R. Appelquist, Marko-Varga, G., Gorton, L., Torstensson, A., Johansson, G., *Analytica Chimica Acta* **1985**, *169*, 237.
- [96] F. D. Munteanu, Okamoto, Y., Gorton, L., *Analytica Chimica Acta* **2003**, *476*, 43.
- [97] A. Torstensson, Gorton, L., *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1981**, *130*, 199.
- [98] B. A. Gregg, A. Heller, *Journal of Physical Chemistry* **1991**, *95*, 5970.
- [99] B. A. Gregg, A. Heller, *Journal of Physical Chemistry* **1991**, *95*, 5976.
- [100] M. Hedenmo, A. Narvaez, E. Dominguez, I. Katakis, *Analyst* **1996**, *121*, 1891.
- [101] D. L. Wang, A. Heller, *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 1069.
- [102] M. V. Pishko, I. Katakis, S. E. Lindquist, L. Ye, B. A. Gregg, A. Heller, *Angewandte Chemie-International Edition* **1990**, *29*, 82.
- [103] L. Stoica, N. Dimcheva, Y. Ackermann, K. Karnicka, D. A. Guschin, P. J. Kulesza, J. Rogalski, D. Haltrich, R. Ludwig, L. Gorton, W. Schuhmann, *Fuel Cells* **2009**, *9*, 53.
- [104] K. Habermuller, A. Ramanavicius, V. Laurinavicius, W. Schuhmann, *Electroanalysis* **2000**, *12*, 1383.
- [105] M. a. D. Tian, S., *Electroanalysis* **1995**, *7*, 1063.
- [106] R. Ghosh, J. R. Quayle, *Analytical Biochemistry* **1979**, *99*, 112.
- [107] N. S. Lawrence, J. Wang, *Electrochemistry Communications* **2006**, *8*, 71.
- [108] A. S. Santos, Gorton, L., Kubota, L. T., *Electrochimica Acta* **2002**, *47*, 3351.
- [109] D. D. Schlereth, Katz, E., Schmidt, H.-L., *Electroanalysis* **1995**, *7*, 46.
- [110] J. Kulys, Kristopaitis, K., Scheller, F. W., Wollenberger, U., *Electroanalysis* **2004**, *16*, 183.

- [111] A. A. Karyakin, Y. N. Ivanova, K. V. Revunova, E. E. Karyakina, *Analytical Chemistry* **2004**, 76, 2004.
- [112] Y. Dilgin, L. Gorton, G. Nisli, *Electroanalysis* **2007**, 19, 286.
- [113] T. J. Ohara, R. Rajagopalan, A. Heller, *Analytical Chemistry* **1994**, 66, 2451.
- [114] P. D. Hale, L. I. Boguslavsky, T. Inagaki, H. I. Karan, H. S. Lee, T. A. Skotheim, Y. Okamoto, *Analytical Chemistry* **1991**, 63, 677.
- [115] H.-Z. Bu, Mikkelsen, S.-R., English, A.-M., *Analytical Chemistry* **1998**, 70, 4320.
- [116] T. Matsue, M. Suda, I. Uchida, T. Kato, U. Akiba, T. Osa, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1987**, 234, 163.
- [117] L. Y. S. Lee, T. C. Sutherland, S. Rucareanu, R. B. Lennox, *Langmuir* **2006**, 22, 4438.
- [118] B. Kazakeviciene, Valincius, G., Niaura, G., Kazemekaite, M., Straukas, J., Razumas, V., *Biologija* **2003**, 4, 13.
- [119] J. J. Sumner, K. S. Weber, L. A. Hockett, S. E. Creager, *Journal of Physical Chemistry B* **2000**, 104, 7449.
- [120] J. Chen, A. K. Burrell, G. E. Collis, D. L. Officer, G. F. Swiegers, C. O. Too, G. G. Wallace, *Electrochimica Acta* **2002**, 47, 2715.
- [121] J. X. Yu, J. G. Shapter, M. R. Johnston, J. S. Quinton, J. J. Gooding, *Electrochimica Acta* **2007**, 52, 6206.
- [122] M. Kurihara, M. Kurosawa, T. Matsuda, H. Nishihara, *Synthetic Metals* **1999**, 102, 1517.
- [123] T. Tatsuma, N. Oyama, *Polymers for Advanced Technologies* **1997**, 8, 534.
- [124] S. X. Zhang, W. W. Yang, Y. M. Niu, C. Q. Sun, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2004**, 101, 387.
- [125] M. P. G. Armada, J. Losada, I. Cuadrado, B. Alonso, B. Gonzalez, E. Ramirez-Oliva, C. M. Casado, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2003**, 88, 190.
- [126] K. Yokoyama, A. Wakabayashi, K. Noguchi, N. Nakamura, H. Ohno, *Inorganica Chimica Acta* **2006**, 359, 807.
- [127] G. Hilt, Jarbawi, T., Heineman, W. R., Steckhan, E., *Chemistry-a European Journal* **1997**, 3, 79.
- [128] I. Lapenaite, Kurtinaitiene, B., Anusevicius, P., Sarlauskas, J., Bachmatova, I., Marcinkevieiene, L., Laurinavicius, V., Ramanavicius, A., *Biologija* **2004**, 1, 20.

- [129] H. I. Karan, Hale, P.D., Lan, H. L., Lee, H. S., Liu, L. F., Skotheim, T. A., Okamoto, Y., *Polymers for Advanced Technologies* **1991**, 2, 229.
- [130] A. Christenson, T. Gustavsson, L. Gorton, C. Hagerhall, *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **2008**, 1777, 1203.
- [131] R. Iyer, V. Pavlov, I. Katakis, L. G. Bachas, *Analytical Chemistry* **2003**, 75, 3898.
- [132] J. J. Fernandez, J. R. Lopez, X. Correig, I. Katakis, *Sensors and Actuators B-Chemical* **1998**, 47, 13.
- [133] Q. Wu, M. Maskus, F. Pariente, F. Tobalina, V. M. Fernandez, E. Lorenzo, H. D. Abruna, *Analytical Chemistry* **1996**, 68, 3688.
- [134] S. Y. Gao, X. Li, C. P. Yang, T. H. Li, R. Cao, *Journal of Solid State Chemistry* **2006**, 179, 1407.
- [135] I. C. Popescu, E. Dominguez, A. Narvaez, V. Pavlov, I. Katakis, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1999**, 464, 208.
- [136] M. B. Santiago, Velez, M. M., Borrero, S., Diaz, A., Casillas, c. A., Hofmann, C., Guadalupe, A. R., Colon, J. L., *Electroanalysis* **2006**, 18, 559.
- [137] S. Timur, Y. Yigzaw, L. Gorton, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2006**, 113, 684.
- [138] S. Timur, Haghghi, B., Tkac, J., Pazarhoglu, N., Telefoncu, A., Gorton, L., Domínguez, E., *Bioelectrochemistry* **2007**, 71, 38.
- [139] B. P. Sullivan, D. J. Salmon, T. J. Meyer, *Inorganic Chemistry* **1978**, 17, 3334.
- [140] N. Mano, Peyrou, P., Kuhn, A., *Electroanalysis* **2001**, 13, 770.
- [141] N. Mano, Kuhn, A., Menu, St., Dufourc, E., *Physical Chemistry Chemical Physics* **2003**, 5, 2082.
- [142] S. Ben-Ali, Cook, D. A., Bartlett, P. N., Kuhn, A., *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2005**, 579, 181.
- [143] F. D. Munteanu, Mano, N., Kuhn, A., Gorton, L., *Electroanalytical Chemistry* **2004**, 564, 167.
- [144] J. Gajdzik, Szamocki, R., Natter, H., Kohring, G. W., Giffhorn, F., Hempelmann, R., *Journal of solid state electrochemistry* **2007**, 11, 144.
- [145] N. Mano, Kuhn, A., *Talanta* **2005**, 66, 21.
- [146] N. Mano, Kuhn, A., *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2001**, 498, 58.
- [147] N. Mano, Kuhn, A., *Biosensors & Bioelectronics* **2001**, 16, 653.
- [148] N. Mano, Kuhn, A., *Bioelectrochemistry* **2002**, 56, 123.

- [149] F. D. Munteanu, Mano, N., Kuhn, A., Gorton, L., *Bioelectrochemistry* **2002**, *56*, 67.
- [150] S. Ben-Ali, Cook, D. A., Evans, S., A. G., Thienpont, A., Bartlett, P. N., Kuhn, A., *Electrochemistry Communications* **2003**, *5*, 747.
- [151] R. Szamocki, Resulusa, S., Ravaine, S., Bartlett, P., N., Kuhn, A., Hempelmann, R., *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 1317.
- [152] N. Mano, Thienpont, A., Kuhn, A., *Electrochemistry Communications* **2001**, *3*, 585.
- [153] N. Mano, J. E. Yoo, J. Tarver, Y. L. Loo, A. Heller, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 7006.
- [154] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, 2 ed., Wiley, **2000**.
- [155] V. Chechik, H. Schonherr, G. J. Vancso, C. J. M. Stirling, *Langmuir* **1998**, *14*, 3003.
- [156] V. Chechik, R. M. Crooks, C. J. M. Stirling, *Advanced Materials* **2000**, *12*, 1161.
- [157] K. Nakano, K. Ohkubo, H. Taira, M. Takagi, T. Imato, *Analytica Chimica Acta* **2008**, *619*, 30.
- [158] G. X. Li, L. Chen, J. Q. Zhu, D. X. Zhu, D. F. Untereker, *Electroanalysis* **1999**, *11*, 139.
- [159] K. D. Snell, A. G. Keenan, *Chemical Society Reviews* **1979**, *8*, 259.
- [160] X. Liu, K. G. Neoh, E. T. Kang, *Langmuir* **2002**, *18*, 9041.
- [161] H. Yamada, H. Imahori, Y. Nishimura, I. Yamazaki, S. Fukuzumi, *Advanced Materials* **2002**, *14*, 892.
- [162] B. Persson, L. Gorton, G. Johansson, A. Torstensson, *Enzyme and Microbial Technology* **1985**, *7*, 549.
- [163] M. S. P. Lopez, E. Lopez-Cabarcos, B. Lopez-Ruiz, *Biomolecular Engineering* **2006**, *23*, 135.
- [164] Y. Lvov, H. Haas, G. Decher, H. Mohwald, A. Kalachev, *Journal of Physical Chemistry* **1993**, *97*, 12835.
- [165] Y. Lvov, G. Decher, H. Mohwald, *Langmuir* **1993**, *9*, 481.
- [166] G. Decher, J. D. Hong, *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics* **1991**, *95*, 1430.
- [167] G. Decher, J. D. Hong, J. Schmitt, *Thin Solid Films* **1992**, *210*, 831.
- [168] U. Lange, N. V. Roznyatouskaya, V. M. Mirsky, *Analytica Chimica Acta* **2008**, *614*, 1.
- [169] M. Beissenhartz, F. Scheller, F. Lisdat, *Electroanalysis* **2003**, *15*, 1425.
- [170] M. K. Beissenhartz, B. Kafka, D. Schafer, M. Wolny, F. Lisdat, *Electroanalysis* **2005**, *17*, 1931.
- [171] Z. Huan, Persson, B., Gorton, L., Sahni, S., Skotheim, T., Bartlett, P., *Electroanalysis* **1996**, *8*, 575.

- [172] M. Gundogan-Paul, S. S. Celebi, H. Ozyoruk, A. Yildiz, *Biosensors & Bioelectronics* **2002**, *17*, 875.
- [173] M. M. Barsan, E. M. Pinto, C. M. A. Brett, *Electrochimica Acta* **2008**, *53*, 3973.
- [174] N. Gajovic, Habermüller, K., Warsinke, A., Schuhmann, W., Scheller, F. W., *Electroanalysis* **1999**, *11*, 1377.
- [175] N. Kuramoto, Y. Shishido, K. Nagai, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **1997**, *35*, 1967.
- [176] T. Tatsuma, K. Saito, N. Oyama, *Analytical Chemistry* **1994**, *66*, 1002.
- [177] P. D. Hale, L. I. Boguslavsky, T. Inagaki, H. S. Lee, T. A. Skotheim, H. I. Karan, Y. Okamoto, *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **1990**, *190*, 251.
- [178] R. Antiochia, Gorton, L., *Biosensors & Bioelectronics* **2007**, *22*, 2611.
- [179] T. Taniguchi, M. Kuroki, T. Miyashita, *Colloid and Polymer Science* **1996**, *274*, 717.
- [180] P. J. Peerce, Bard, A. J., *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1980**, *114*, 89.
- [181] E. Laviron, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1979**, *101*, 19.
- [182] J. M. Goddard, J. H. Hotchkiss, *Progress in Polymer Science* **2007**, *32*, 698.
- [183] N. Oyama, T. Tatsuma, K. Takahashi, *Journal of Physical Chemistry* **1993**, *97*, 10504.
- [184] A. Laschewsky, (Ed.: D. Gajovic-Eichelmann), **2009**.
- [185] P. Hale, L. Boguslavsky, T. Inagaki, H. Karan, H. Lee, T. Skotheim, Y. Okamoto, *Analytical Chemistry* **1991**, *63*, 677.
- [186] C. A. C. Barreto, Santiago, M. B., Velez, M. M., Diaz, A., Guadalupe, A. R., Colon, J. L., *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2005**, *229*, U519.
- [187] N. Rivera, Colón, Y., Guadalupe, A.R., *Bioelectronics Bioenergetics* **1994**, *34*, 169.
- [188] C. A. Goss, H. D. Abruna, *Inorganic Chemistry* **1985**, *24*, 4263.
- [189] M. S. Newman, Boden, H., *Organic Syntheses, Coll.* **1973**, *5*, 1029.
- [190] D. Blauch, N., Savéant, J.-M., *Journal of American Chemical Society* **1992**, *114*, 3323.
- [191] S. H. Zuo, Y. J. Teng, H. H. Yuan, M. B. Lan, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2008**, *133*, 555.
- [192] R. S. Nicholson, I. Shain, *Analytical Chemistry* **1964**, *36*, 706.
- [193] K. Habermüller, Ruhr-University (Bochum), **1999**.
- [194] G. Xuan, M. Kim, D. Her, H. Lee, *Chinese Journal of Chemistry* **2006**, *24*, 546.
- [195] G. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, **1996**.

- [196] J. Kulys, A. Drungiliene, U. Wollenberger, K. Krikstopaitis, F. Scheller, *Electroanalysis* **1997**, *9*, 213.
- [197] K. Digleria, H. A. O. Hill, C. J. Mcneil, M. J. Green, *Analytical Chemistry* **1986**, *58*, 1203.
- [198] F. F. Bier, E. EhrentreichForster, A. Makower, F. W. Scheller, *Analytica Chimica Acta* **1996**, *328*, 27.
- [199] B. Nagel, Warsinke. A, Katterle, M., *Langmuir* **2007**, *23*, 6807.
- [200] S. M. Southall, J. J. Doel, D. J. Richardson, A. Oubrie, *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 30650.
- [201] S. Tanaka, Igarashi, S., Ferri, S., Sode, K., *BMC Biochemistry* **2005**, *6*, 1.
- [202] N. Nakadan, S. Imabayashi, M. Watanabe, *Langmuir* **2004**, *20*, 8786.
- [203] B. Elsholz, Nitsche, A., Achenbach, J., Ellerbrok, H., Blohm, L., Albers, J., Pauli, G., Hintsche, R., Wörl, R., *Biosensors & Bioelectronics* **2009**, *24*, 1737.
- [204] K. Dill, D. D. Montgomery, A. L. Ghindilis, K. R. Schwarzkopf, S. R. Ragsdale, A. V. Oleinikov, *Biosensors & Bioelectronics* **2004**, *20*, 736.

**Anhang**



**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

$^{13}\text{C}$ -NMR	$^{13}\text{C}$ Kohlenstoff-Kernresonanzspektrometrie
$^1\text{H}$ -NMR	$^1\text{H}$ Protonen-Kernresonanzspektrometrie
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyessigsäure
AE	Arbeitselektrode
Ag AgCl	Silber-Silberchlorid-Referenzelektrode
AK	Antikörper
Anti-FITC-POD	Anti-FITC-Antikörper mit Peroxidase markiert
Anti-FITC-sGDH	Anti-FITC-Antikörper mit PQQ-Glucosedehydrogenase markiert
Anti-IgG-AP	Anti-Maus-IgG-Antikörper mit Alkalischer Phosphatase markiert
Au	Goldelektrode
bpy	Bipyridin
$\text{Ca}^{2+}$	Calciumionen
CP	Cyclopentadien
CPE	Kohlenstoffpaste-Elektrode
CTF	(4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenon)
CV	Cyclische Voltammetrie oder Voltammogramm
Cyt c	Cytochrom c
d.h.	das heißt
DTP-NHS	Dithiodi(propionsäure- <i>N</i> -hydroxysuccinimidylester)
$e^-$	Elektron
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET	Elektronentransfer
F oder Fc	Ferrocen
FC-Teil	kristallisierendes Fragment der Antikörper
Fe-S-Cluster	Eisen-Schwefel-Cluster
FITC	Fluorescein
FITC-BSA	Fluorescein-Rinderserumalbumin
GCE	Glaskohlenstoffelektrode
GDH	Glucosedehydrogenase
GE	Gegenelektrode
GPC	Gelpermeationschromatographie
$\text{H}^+$	Proton
HbA1c	glykiertes Hämoglobin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
Hp	Haptoglobin
ITO	Indiumzinnoxid-Elektrode
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry

---

LbL	Layer-by-Layer
LCST	untere kritische Entmischungstemperatur
NAD	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid reduziert
NADP	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-Phosphat
NHS-Ester	<i>N</i> -Hydroxysuccinimidylester
Ni-IDA	Nickel-Iminodiessigsäure
OEGMA-MEO <sub>2</sub> -MA	Oligo(ethylenglykolmethacrylat)-2-(2-Methoxyethoxy)ethylmethacrylat
Os	Osmium
ox	oxidierte Spezies
P	Produkt
PAA	Poly(acrylsäure)
PBS	Phosphate-buffered saline - Phosphatpuffer
PD	1,10-Phenanthrolin-5,6-dion
PEG	Poly(ethylenglykol)
PEGMA	Poly(ethylenglykolmethacrylat)
PEGMA-CTF-SH	PEGMA-Polymer mit Carboxy-Trinitrofluorenol-Mediator und Thiollinker
PEGMA-Fc-SH	PEGMA-Polymer mit Ferrocen-Mediator und Thiollinker
PEGMA-Fc-SS	PEGMA-Polymer mit Ferrocen-Mediator und Disulfidlinker
PEGMA-RuPD-SH	PEGMA-Polymer mit Ruthenium-Phenanthrolindion-Mediator und Thiollinker
PEGMA-RuPD-SS	PEGMA-Polymer mit Ruthenium-Phenanthrolindion-Mediator und Disulfidlinker
pH	pH-Wert
PMMA	Poly(methylmethacrylsäure)
<i>P</i> nBA	Poly( <i>n</i> -Butylacrylat)
PNIPAM	Poly( <i>N</i> -Isopropylacrylamid)
PNIPAMFoxy	PNIPAM-Polymer mit Ferrocen-Mediator und Epoxylinker
PNIPAM-RuPD-NH <sub>2</sub>	PNIPAM-Polymer mit Ruthenium-Phenanthrolindion-Mediator und Aminolinker
pNPP	<i>p</i> -Nitrophenylphosphat
POD	Peroxidase
PQQ	Pyrrlochinolinchinon
Pt	Platinelektrode
RE	Referenzelektrode
red	reduzierte Spezies
RT	Raumtemperatur (hier 20°C)
Ru	Ruthenium
RuPD oder [Ru(PD) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	Ruthenium-1,10-Phenanthrolin-5,6-dion-Komplex
S	Substrat
SAM	Selbstassemblierte Monoschicht
SCE	gesättigte Kalomelektrode (Referenzelektrode)

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SR	Scanrate = Vorschubgeschwindigkeit
SSCE	Natrium-gesättigte Kalomelelektrode
SWV	Square-Wave-Voltammetrie oder Voltammogramm
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
UQ	Ubichinon
UV/Vis	Ultraviolett/sichtbar
Vgl.	Vergleich
z.B.	zum Beispiel

### Physikalische Größen

A	Elektrodenfläche (cm <sup>2</sup> )
Abs	Absorption
c	Analytkonzentration (mol l <sup>-1</sup> )
D	Diffusionskoeffizient (cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
Δe	ausgetauschte Ladung
ΔE <sub>p</sub>	Peakseparation (V)
ΔG*	Gibbs-Aktivierungsenergie (J)
ΔG <sup>0</sup>	Gibbs-Standardenergiedifferenz (J)
D <sub>op</sub>	optische Dielektrizitätskonstante
D <sub>s</sub>	statistische Dielektrizitätskonstante
E	Potential (V)
E <sub>1/2</sub>	Halbstufenpotential (V)
E <sub>pa</sub>	anodisches Peakpotential (V)
E <sub>pc</sub>	kathodisches Peakpotential (V)
F	Faraday-Konstante (96 485 C mol <sup>-1</sup> )
Γ	Oberflächenbelegung (mol cm <sup>-2</sup> )
η	Überspannung (V)
I	Strom (A)
I <sub>pa</sub>	anodischer Peakstrom (A)
I <sub>pc</sub>	kathodischer Peakstrom (A)
k <sub>B</sub>	Boltzmann-Konstante (1.380 658 × 10 <sup>-23</sup> J K <sup>-1</sup> )
	Geschwindigkeitskonstante für heterogenen
k <sub>s</sub>	Elektronentransfer (s <sup>-1</sup> )
λ	Wellenlänge (nm)
λ	Reorganisationsterm

$\lambda_0$	lösungsmittelabhängiger Term
$\lambda_i$	Schwingungsterm
ln	dekadischer Logarithmus
log	natürlicher Logarithmus
M	Molare Masse ( $\text{g mol}^{-1}$ oder $\text{kD}$ )
$\nu$	Scanrate ( $\text{V s}^{-1}$ )
n	Anzahl der wiederholten Messungen
Q	Ladung (C)
R	Allgemeine Gaskonstante ( $8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )
T	Temperatur (K)
z	Anzahl der Elektronen

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abb. 1	Schematische Darstellung eines Enzymbiosensors in Parallelanordnung.....	2
Abb. 2	Vergleichende schematische Darstellung biologischer und biohybrider Redoxsysteme.....	3
Abb. 3	Schema der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran.....	4
Abb. 4	Schematische Darstellung von Biosensoren.....	7
Abb. 5	Schematische Darstellung der Biosensor-Generationen.....	8
Abb. 6	Auftragung der Gibbs-Energie gegen die Reaktionskoordinate für Reaktanten und Produkte einer Elektronentransfer-Reaktion.....	10
Abb. 7	Strukturbeispiele Elektronenübertragender Gruppen in nativen Systemen.....	11
Abb. 8	Redoxreaktion der PQQ-GDH.....	12
Abb. 9	Strukturmodell der PQQ-GDH aus <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .....	12
Abb. 10	Redoxreaktion der Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-Glucosedehydrogenase.....	13
Abb. 11	Strukturmodell der NAD-GDH aus <i>Bacillus sp.</i> ....	13
Abb. 12	Schema des Poly( <i>N</i> -Isopropylacrylamides).....	15
Abb. 13	Schema von Poly(ethylenglykol) und Poly(ethylenglykolmethacrylat).....	16
Abb. 14	Vergleich der Strukturen von 18-Krone-6 und Poly(ethylenglykolmethacrylat).....	17
Abb. 15	Ausgewählte Strukturformeln häufig verwendeter organischer und Organometall-Mediatoren.....	19
Abb. 16	Strukturformeln von Cyclopentadien und Cyclopentadienylanion und Redoxverhalten von Ferrocen(-derivaten).....	20
Abb. 17	Strukturformel des 1,10-Phenanthrolin-5,6-dions mit dem <i>o</i> -Chinon-Anteil.....	21
Abb. 18	Reversible Reduktion von 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion .....	22
Abb. 19	Strukturformel des 4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenon (CTF).....	22
Abb. 20	Reaktionsschema für die Aktivierung und reversible Oxidation/Reduktion der Nitrogruppen des CTF .....	23
Abb. 21	Schema der Komplexierung von CTF und NADH über eine $\text{Ca}^{2+}$ -Koordination.....	23
Abb. 22	Mediatormonoschicht- und polymermodifizierte Elektrodenoberflächen in Wechselwirkung mit redoxaktiven Enzymen.....	26
Abb. 23	Beispiele für die Bildung der kovalenten Schichten auf Silber-, Gold-, Glaskohlenstoff-, Indiumzinnoxid- und Platin-Elektroden.....	28
Abb. 24	Schema einer Hydrogelmodifizierten Elektrode mit kovalent integrierten Redoxzentren zur Kontaktierung von redoxaktiven Enzymen.....	31
Abb. 25	Strukturformeln der verwendeten Redoxmediatoren 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion, Ferrocen und 4-Carboxy-2,5,7-Trinitrofluorenon.....	32
Abb. 26	Schema typischer Cyclischer Voltammogramme für diffusionsabhängige und diffusionsunabhängige Redoxprozesse .....	37
Abb. 27	Synthese 6-(Pyridin-2-yl-disulfanyl)hexylmethacrylat.....	40
Abb. 28	Synthese von Dithiodi((2-propanoyloxy)ethylmethacrylat).....	40
Abb. 29	Synthese von PNIPAMFoxy .....	40
Abb. 30	Absorptionsspektren für PNIPAMFoxy und PNIPAMF .....	42

Abb. 31	Schema des PNIPAMF- und PNIPAMFoxy-Polymeres .....	42
Abb. 32	Abhängigkeiten der kathodischen Peakströme von der Scanrate für PNIPAMFoxy- im Vergleich zu PNIPAMF-modifizierten Goldelektroden .....	43
Abb. 33	Stabilität des Peakpotentials und der Peakströme für PNIPAMFoxy-modifizierte Elektroden.....	44
Abb. 34	Transmissionsmessung zur Ermittlung der LCST von PNIPAMFoxy und PNIPAMF.....	44
Abb. 35	Abhängigkeit des Peakpotentials vom pH-Wert für PNIPAMFoxy-modifizierte Goldelektroden.....	45
Abb. 36	Synthese von PEGMA-Fc-SH und PEGMA-Fc-SS .....	46
Abb. 37	Schema der Ankopplung von PEGMA-Fc-SH und PEGMA-Fc-SS an Goldelektroden.....	47
Abb. 38	Strategien für die Integration des 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion in das Redoxpolymer .....	49
Abb. 39	Synthese von 1-(4-Hydroxybutyl)-1,2-dihydro-1,10-Phenanthrolin-5,6-dion.....	50
Abb. 40	Mögliche kovalente und ionische Dimerbildung alkylierter 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion.....	50
Abb. 41	Synthese von $[\text{Ru}(\text{PD})_2]^{2+}$ -Komplex.....	51
Abb. 42	Square-Wave-Voltammogramme von Phenanthrolindion, Ruthenium-Phenanthrolin und Ruthenium- Phenanthrolindion-Komplex .....	52
Abb. 43	Schema der Integration des $[\text{Ru}(\text{PD})_2]^{2+}$ -Komplexes über einen Pyridinliganden in die Polymere.....	53
Abb. 44	Syntheseweg für 3-(Pyridin-4-yl)propylmethacrylat.....	53
Abb. 45	Synthesewege für PNIPAM-RuPD-NH <sub>2</sub> .....	54
Abb. 46	Absorptionsspektren für PNIPAM-RuPD-NH <sub>2</sub> ; $[\text{Ru}(\text{PD})_2]^{2+}$ , PD und das mediatorlose Vergleichspolymer .....	55
Abb. 47	Oberflächenmodifizierung mit 3,3'-Dithiodi(propionsäure-N-hydroxysuccinimidylester) und PNIPAM-RuPD-NH <sub>2</sub> .....	55
Abb. 48	Cyclisches Voltammogramm und Square-Wave-Voltammogramm für PNIPAM-RuPD-NH <sub>2</sub> -modifizierte Goldelektroden.....	56
Abb. 49	Stabilität der PNIPAM-RuPD-NH <sub>2</sub> -modifizierten Goldelektroden .....	57
Abb. 50	Synthese von PEGMA-RuPD-SH und PEGMA-RuPD-SS .....	58
Abb. 51	Syntheseweg des (4-Carboxy-2,5,7-Trinitro-9-fluorenyliden)malononitrils.....	62
Abb. 52	Verschiedene Aktivierungspotentiale zur Aktivierung der unterschiedlichen Nitrogruppen des CTFM.....	63
Abb. 53	Absorptionsspektren für CTFM im Vergleich zum polymerisierbaren CTF-Derivat .....	63
Abb. 54	Darstellung des polymerisierbaren 4-Carboxy-2,5,7-Trinitrofluorenon-Derivats.....	64
Abb. 55	Synthese von PEG-CTF-SH.....	64
Abb. 56	Absorptionsspektren für PEGMA-CTF-SH im Vergleich zu Allyl-CTF .....	65
Abb. 57	Modellvorschlag für die PEGMA-CTF-SH-Ankopplung auf Goldelektroden.....	66
Abb. 58	Ausschnitt einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	70
Abb. 59	Cyclische Voltammogramme einer PNIPAMFoxy-modifizierten Goldelektrode .....	72
Abb. 60	Vergleich der Enzymkatalysen durch PEGMA-Fc-SS-modifizierte Goldelektroden.....	73
Abb. 61	Vergleich der Enzymkatalysen durch PEGMA-Fc-SH-modifizierte Goldelektroden.....	73
Abb. 62	Cyclische Voltammogramme einer PNIPAM-RuPD-NH <sub>2</sub> -modifizierten Goldelektrode.....	74

---

Abb. 63	Cyclische Voltammogramme einer PEG-CTF-SH-modifizierten Goldelektrode.....	75
Abb. 64	Schema für die elektrochemische und optische Detektion des Immunoassay.....	76
Abb. 65	Ausschnitte einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	77
Abb. 66	Korrelation der Absorption mit der Uraninkonzentration im optischen kompetitiven Immunoassay mit Anti-FITC-POD-Konjugat.....	78
Abb. 67	Konzentrationsabhängigkeiten der Stromsignale von PNIPAMFoxy-modifizierten Goldelektroden mit PQQ-GDH und Anti-FITC-sGDH-Konjugat.....	78
Abb. 68	Temperaturabhängigkeit des katalytischen Stroms an Gold-PNIPAMFoxy und in PNIPAMF-Lösung .....	82
Abb. 69	Modellvorschlag für den Temperatureffekt von PNIPAMF und PNIPAMFoxy-modifizierte Goldelektroden.....	83
Abb. 70	Strukturvorschlag für die inter- und intramolekularen Calciumkomplexe für zwei PEGMA-Polymerketten.....	84
Abb. 71	Abhängigkeit der Absorption von PEGMA-Fc-SH und PEGMA-Fc-SS von der Calciumkonzentration.....	85
Abb. 72	Abhängigkeit des Stroms von der Calciumkonzentration mit PEGMA-Fc-SH- und PEGMA-Fc-SS-modifizierten Goldelektroden .....	86
Abb. 73	Modellvorschlag für den Effekt der $Ca^{2+}$ -Ionen auf PEGMA-modifizierte Goldelektroden.....	86
Abb. 74	Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Glucosekonzentration bei photometrischer Detektion .....	87
Abb. 75	Konzentrationsabhängigkeit für Glucose mit PEGMA-Fc-SS-modifizierten Goldelektroden..	87
Abb. 76	Konzentrationsabhängigkeit für Glucose mit PEGMA-Fc-SS-modifizierten Goldelektroden..	88
Abb. 77	Einsatzmöglichkeiten der neuen schaltbaren Redoxpolymere in Enzymmicroarrays.....	89
Abb. 78	Vergleichende Abbildungen zweidimensionaler und dreidimensionaler Elektrodenmodifizierungen.....	91
Abb. 79	Einsatzmöglichkeit der neuen schaltbaren Redoxpolymere in Enzymmicroarrays.....	94
Abb. 80	Typischer Kurvenverlauf einer amperometrischen Messkurve.....	100



## Danksagung

Ich danke allen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben!

Herrn Prof. Dr. Frieder W. Scheller danke ich für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung und Förderung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Frank F. Bier danke ich für die freundliche Aufnahme im Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik, Potsdam, und die Förderung der Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Martin Katterle für die tatkräftige Unterstützung dieser Arbeit und der Erweiterung meiner wissenschaftlichen und persönlichen Kompetenzen.

Ich danke Herrn Dr. Nenad Gajovic-Eichelmann und Herrn Dr. habil. Axel Warsinke für die Unterstützung der Arbeit und die wissenschaftlichen Diskussionen.

Meinen „Büromitbewohnern“ Edda und Ines danke ich für die warmherzige, freundliche Aufnahme, die große Hilfe und die vielen fröhlichen Stunden, zusammen mit Thomas, Dirk, Soeren „007“ und Irene.

Ich danke allen weiteren Mitarbeitern des Fraunhofer Instituts für Biomedizinische Technik und der AG „Biomimetische Systeme und Materialien“ für das erfrischende Arbeitsklima, die selbstverständliche Hilfe und viel Spaß neben der Arbeit, vor allem Bianca für die Super-Labororganisation. Herrn Dr. Oliver Pänke und Dr. Kai Strotmeyer danke ich für die Hilfe im Labor und für die hilfreichen, wissenschaftlichen Diskussionen. Esther Lather und Jessica Meißner danke ich für die fleißige Hilfe im Labor. Ein großer Dank geht auch an die Mitarbeiter der ehemaligen AG Analytische Biochemie der Universität Potsdam.

Frau Marlies Gräwert und Herrn Dr. Helmut Schlaad vom Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Potsdam, danke ich für die Gelpermeationschromatographie-Messungen.

Meiner Mentorin Frau Dr. Barbara Thomas danke ich für die materielle Unterstützung meiner Doktorarbeit, für die beruflichen und persönlichen Erfahrungen, die sie an mich weitergegeben hat und für ihre herzliche Art.

Mein besonderer Dank gilt meiner ganzen Familie für ihre moralische und finanzielle Unterstützung während der Arbeit. Besondere Freude bereitet mir das naturwissenschaftliche Interesse von Jannik und Jule und unsere gemeinsamen Experimente.

Ich danke allen meinen Freunden - in Deutschland und der Schweiz - für das Interesse an der Arbeit, die moralische Unterstützung und das Leben neben der Arbeit. Danke!

Ich danke Martin, Bettina, Christian, Thomas und Irene für das kritische Korrekturlesen.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst habe. Ich habe keine anderen Quellen und Hilfsmittel, als die in dieser Arbeit angegebenen, verwendet.

Potsdam,

---

---

Birgit Nagel