

# **Meerrettich Peroxidase: Modifikationen und Anwendungen in Biosensoren**

## **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

**Noya Loew**

Elektronisch veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2008/1843/>  
<urn:nbn:de:kobv:517-opus-18430>  
[<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-18430>]

## Inhaltsverzeichnis

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	IV
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	VI
<b>ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE</b> .....	VII
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	1
1.1. BIOSENSOREN .....	3
1.1.1. <i>Affinitätssensoren</i> .....	3
1.1.2. <i>Katalytische Sensoren</i> .....	3
1.1.3. <i>Optische Sensoren</i> .....	4
1.1.4. <i>Kalorimetrische Sensoren</i> .....	4
1.1.5. <i>Gravimetrische Sensoren</i> .....	4
1.1.6. <i>Elektrochemische Sensoren</i> .....	5
1.2. IMMOBILISIERUNGSVERFAHREN .....	5
1.2.1. <i>Adsorption</i> .....	5
1.2.2. <i>Einschluss</i> .....	6
1.2.3. <i>Kovalente Kopplung</i> .....	6
1.3. AMPEROMETRISCHE ENZYM-ELEKTRODEN .....	7
1.4. ANWENDUNG VON BIOSENSOREN .....	8
<b>2. ZIELSTELLUNG</b> .....	11
<b>3. THEORETISCHE GRUNDLAGEN</b> .....	13
3.1. MEERRETTICH PEROXIDASE .....	14
3.2. TEIL A: MEDIZINISCHE ANWENDUNG .....	17
3.2.1. <i>HRP-Elektroden und ihre Anwendung</i> .....	17
3.2.2. <i>Wasserstoffperoxid in biologischen Systemen</i> .....	18
3.2.3. <i>Atemkondensat</i> .....	19
3.2.4. <i>Chemotherapie und Neutrophile Granulozyten</i> .....	21
3.2.5. <i>Energie-Stoffwechsel im Skelettmuskel</i> .....	23
3.3. TEIL B: ELEKTRODENMATERIAL .....	25
3.3.1. <i>HRP-Elektroden und Elektronentransfer</i> .....	25
3.3.2. <i>HRP-Elektroden aus Kohlepasten</i> .....	28
3.3.3. <i>Modifizierter Graphit aus CoTMPP</i> .....	29
3.4. TEIL C: ENZYM .....	31
3.4.1. <i>Metall-substituierte Häm-Proteine</i> .....	31
3.4.2. <i>Osmium-Porphyrin</i> .....	34

<b>4. MATERIALIEN UND METHODEN</b> .....	36
4.1. TEIL A: MEDIZINISCHE STUDIEN.....	37
4.1.1. <i>Atemkondensat-Sammlung</i> .....	37
4.1.2. <i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Atemluft</i> .....	37
4.1.3. <i>Laktat in der Atemluft</i> .....	38
4.1.4. <i>Laktat im Blut</i> .....	38
4.1.5. <i>Messprotokoll Charité</i> .....	38
4.1.6. <i>Messprotokoll Sportmedizin</i> .....	39
4.2. TEIL B: PYROLYSIERTES COTMPP ALS ELEKTRODENMATERIAL .....	40
4.2.1. <i>Präparation von Pyrolysierten MeTMPPs</i> .....	40
4.2.2. <i>Elektrodenpräparation</i> .....	41
4.2.3. <i>Elektrochemische Messungen</i> .....	41
4.2.4. <i>Weitere Chemikalien</i> .....	42
4.3. TEIL C: OSMIUM-SUBSTITUIERTE MEERRETTICH PEROXIDASE .....	43
4.3.1. <i>Os-Protoporphyrin IX Darstellung</i> .....	43
4.3.2. <i>apoHRP-Darstellung</i> .....	44
4.3.3. <i>OsHRP-Darstellung</i> .....	45
4.3.4. <i>Massenspektrometrie</i> .....	45
4.3.5. <i>Infrarot-Spektroskopie</i> .....	45
4.3.6. <i>UV-VIS-Spektroskopie</i> .....	45
4.3.7. <i>Proteinbestimmung und Aktivitätstest</i> .....	46
4.3.8. <i>Elektrochemie</i> .....	47
4.3.9. <i>Kinetik der Reaktion von OsHRP mit Peroxiden</i> .....	48
4.3.10. <i>Spektroelektrochemie</i> .....	49
<b>5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b> .....	50
5.1. TEIL A: MEDIZINISCHE STUDIEN.....	51
5.1.1. <i>Nicht-invasive Verlaufskontrolle der Chemotherapie</i> .....	51
5.1.2. <i>Nicht-invasive Bestimmung der anaeroben Schwelle</i> .....	54
5.2. TEIL B: PYROLYSIERTES COTMPP ALS ELEKTRODENMATERIAL .....	58
5.2.1. <i>Verschiedene Kohlenstoffmaterialien für die Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i> .....	58
5.2.2. <i>Maximaler Elektronentransfer ohne Zusatz eines Mediators</i> .....	60
5.2.3. <i>Einfluss von Schwefel auf den Elektronentransfer</i> .....	63
5.2.4. <i>Chemische Behandlung nach der Pyrolyse</i> .....	64
5.2.5. <i>Porosität: spezifische Oberfläche und Porengröße</i> .....	66
5.2.6. <i>Kinetische Parameter</i> .....	68

5.3.	TEIL C: OSMIUM SUBSTITUIERTE MEERRETTICH PEROXIDASE.....	74
5.3.1.	<i>Osmium-Protoporphyrin IX</i> .....	75
5.3.2.	<i>Axialer CO-Ligand des Os-Porphyrins</i> .....	79
5.3.3.	<i>Darstellung und erste Untersuchungen der OsHRP</i> .....	81
5.3.4.	<i>Kinetische Untersuchung der OsHRP</i> .....	83
5.3.5.	<i>(Spektr-)Elektrochemische Untersuchung der OsHRP</i> .....	88
5.3.6.	<i>Elektrochemie in Gegenwart von Peroxiden</i> .....	91
6.	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	95
7.	<b>LITERATUR</b> .....	99
	<b>ANHANG</b> .....	i

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1	Schema eines Biosensors mit einer Auswahl an Erkennungs- und Transduktionselementen. ....	2
Abbildung 2	Die drei verschiedenen Generationen von Enzym-Elektroden.....	7
Abbildung 3	3D-Struktur der Meerrettich Peroxidase.....	14
Abbildung 4	Struktur des Protoporphyrin IX-Eisen-Komplexes.....	15
Abbildung 5	Die fünf Redoxzustände der Meerrettich Peroxidase.....	16
Abbildung 6	Anwendung von HRP-Elektroden (A) Messung von Peroxid, (B) Messung von Mediator, (C) Messung von Inhibitor. ....	17
Abbildung 7	Mitochondriale Atmungskette mit Komplex I bis Komplex IV, Ubichinon und Cytochrom c. ....	18
Abbildung 8	Teil einer möglichen Struktur von Graphit mit O-reichen Oberflächengruppen.....	28
Abbildung 9	Struktur des Tetramethoxyphenylporphyrin-Kobalt-Komplexes.....	29
Abbildung 10	Teil einer möglichen Struktur von Graphit mit CoN <sub>4</sub> -Zentren. ....	29
Abbildung 11	Struktur des Protoporphyrin IX-Osmium-Komplexes ohne axiale Liganden.....	34
Abbildung 12	Schema der Paste-Elektrode mit Kontaktdraht, Elektrodengrundkörper und Elektrodenspitze mit dem eigentlichen Elektrodenmaterial und Enzym. ....	41
Abbildung 13	Reaktionsgleichung zum Einbau von Os <sup>II</sup> in PIX-DME.....	43
Abbildung 14	Reaktionsgleichung zur Entfernung des CO-Liganden. ....	44
Abbildung 15	Vergleich der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentration im Atemkondensat mit der Neutrophilenzahl im Blut bei Patientin A, vertikale Linien zeigen den Beginn eines neuen Chemotherapie-Zyklus. ....	52
Abbildung 16	Vergleich der Laktat-Konzentration im Atemkondensat mit der Neutrophilenzahl im Blut bei Patientin B. ....	53
Abbildung 17	Vergleich der Laktat-Konzentration im Blut mit der ausgeatmeten Laktat-Menge bei Proband A.....	55
Abbildung 18	Vergleich der Laktat-Konzentration im Blut mit der ausgeatmeten H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Menge bei Proband B.....	55
Abbildung 19	Vergleich der Laktat-Konzentration im Vollblut und Hämolyt bei Proband C. ....	56
Abbildung 20	REM-Aufnahme einer Modifikation von pyrolysiertem, schwefelhaltigem CoTMPP.....	58
Abbildung 21	Vergleich des Reduktionsstroms für 1 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bei Paste-Elektroden aus verschiedenen Materialien.....	59

Abbildung 22	Vergleich des Reduktionsstroms für 1 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bei verschiedener Paste-Elektroden. ....	61
Abbildung 23	Konzentrationsabhängigkeit des Reduktionsstroms von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; FeC <sub>2</sub> O <sub>4</sub> /S/CoTMPP. ....	62
Abbildung 24	Stabilität der CoTMPP-Paste-Elektroden; FeC <sub>2</sub> O <sub>4</sub> /S/CoTMPP. ....	62
Abbildung 25	Abhängigkeit des Reduktionsstroms für 500 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vom Schwefel-Gehalt bei der Pyrolyse. ....	64
Abbildung 26	Abhängigkeit des Reduktionsstroms für 500 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> von chemischer Behandlung nach Pyrolyse. ....	65
Abbildung 27	Verteilung der Poren einiger der untersuchten Materialien. ....	67
Abbildung 28	Abhängigkeit des Reduktionsstroms für 500 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> von der spezifischen Oberfläche und der Porengröße. ....	68
Abbildung 29	Hydrodynamische Voltammogramme für HRP-modifizierte Elektroden aus Material F. ....	69
Abbildung 30	Beispiel für ein Koutecky-Levich-Plot. ....	71
Abbildung 31	Beispiel einer Auftragung der Steigung des Koutecky-Levich-Plots gegen den Kehrwert der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentration. ....	72
Abbildung 32	Beispiel für eine Auftragung von $I_{kin}^{-1}$ gegen den Kehrwert der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentration. ....	72
Abbildung 33	Übersicht über die OsHRP-Darstellung. ....	74
Abbildung 34	Schema eines Os-Protoporphyrin IX-Dimethylester-Dimers. ....	75
Abbildung 35	UV-VIS-Spektrum von Os <sup>II</sup> (PIX-DME)(CO). ....	75
Abbildung 36	CV von Os <sup>II</sup> (PIX-DME)(CO) in DCM. ....	76
Abbildung 37	SWV von Os <sup>II</sup> (PIX)(CO) adsorbiert auf einer PG- bzw. GC-Elektrode. ....	78
Abbildung 38	UV-VIS-Spektrum von Os <sup>VI</sup> (PIX-DME)(O) <sub>2</sub> und Os <sup>III</sup> (PIX-DME)(DCM) <sub>2</sub> . ....	80
Abbildung 39	CV von Os <sup>VI</sup> (PIX-DME)(O) <sub>2</sub> in DCM. ....	80
Abbildung 40	UV-VIS Spektren von FeHRP, OsHRP, apoHRP und „OsPor“. ....	82
Abbildung 41	Einfluss von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf die Lage der Soret-Bande: FeHRP, „OsPor“, OsHRP. ....	83
Abbildung 42	UV-VIS-Spektren von OsHRP in Gegenwart von 1 mM <i>t</i> BuO <sub>2</sub> H; Einschub: drei Absorptionsmaxima der OsHRP. ....	83
Abbildung 43	Kinetik der Absorptionsänderung der OsHRP bei 395 nm in Anwesenheit von 14 mM <i>t</i> BuO <sub>2</sub> H bei pH 9,0. ....	85
Abbildung 44	Konzentrationsabhängigkeit von $k_{1,obs}$ , <i>t</i> BuO <sub>2</sub> H, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; pH 9,0. ....	86
Abbildung 45	Konzentrationsabhängigkeit von $k_{2,obs}$ , <i>t</i> BuO <sub>2</sub> H, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; pH 9,0. ....	87
Abbildung 46	CV von OsHRP im ddab-Film auf GC-Elektrode. ....	88
Abbildung 47	CV von OsHRP in Lösung an einer ITO-Elektrode. ....	89

Abbildung 48	Absorptionsspektrum der OsHRP bei -0,6 V.....	90
Abbildung 49	Potentialabhängigkeit des Quotienten aus $A_{386\text{ nm}}$ und $A_{395\text{ nm}}$ der OsHRP. ..	90
Abbildung 50	CV von OsHRP im ddab-Film, GC-Elektrode, mit und ohne $\text{H}_2\text{O}_2$ . .....	92
Abbildung 51	Amperometrische Messung von $\text{H}_2\text{O}_2$ und $t\text{BuO}_2\text{H}$ mit einer OsHRP/ddab-GC- bzw. FeHRP/ddab-GC-Elektrode. ....	93

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Auswahl an klinisch relevanten Markern, die mit Biosensoren bestimmt werden können.....	9
Tabelle 2	Metall substituierte Häm-Proteine. ....	32
Tabelle 3	Materialien des ersten Screenings. ....	58
Tabelle 4	Elementaranalyse der $\text{FeC}_2\text{O}_4/\text{S}/\text{CoTMPP}$ -Materialien bei verschiedenen S-Zusätzen. ....	63
Tabelle 5	Ausgewählte Eigenschaften der nachbehandelten Materialien.....	64
Tabelle 6	Spezifische Oberfläche und häufigste Porengröße der untersuchten Materialien.....	66
Tabelle 7	Plots und Gleichungen für die Berechnung kinetischer Parameter.....	70
Tabelle 8	Kinetische Parameter für ausgewählte Materialien. ....	73
Tabelle 9	Redoxpotentiale von $\text{Os}^{\text{II}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})$ in DCM.....	76
Tabelle 10	Redoxpotentiale verschiedener Os-Porphyrine in der Literatur. ....	77
Tabelle 11	Redoxpotentiale von auf Kohlenstoff-Elektroden (PG bzw. GC) adsorbiertem $\text{Os}^{\text{II}}(\text{PIX})(\text{CO})$ in Phosphat-Puffer.....	78
Tabelle 12	Redoxpotentiale von $\text{Os}^{\text{VI}}(\text{PIX-DME})(\text{O})_2$ in DCM. ....	81
Tabelle 13	Aktivitäten und Soret-Banden.....	82
Tabelle 14	Soret-Banden der drei OsHRP-Formen .....	84
Tabelle 15	Integrierte Zeitgesetze für Folgereaktionen 1. Ordnung und Reaktionen pseudo-1. Ordnung. ....	85
Tabelle 16	Kinetische Konstanten der Reaktion von OsHRP, MnHRP und FeHRP mit Peroxiden. ....	86
Tabelle 17	Redoxpotentiale der OsHRP; GC/ddab: immobilisiert in ddab-Film, GC-Elektrode, Phosphat-Puffer, pH 7,0.....	91



## Abkürzungen und Symbole

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfonsäure)
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	abgeschwächte Totalreflektion (attenuated total reflection)
BOD	biologischer Sauerstoffverbrauch (biological oxygen demand)
BP	Black Pearls
Cat	Katalase (catalase)
CoHb	kobaltsubstituiertes Hämoglobin
CoMb	kobaltsubstituiertes Myoglobin
COPD	chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease)
CoTMPP	Tetramethoxyphenylporphyrin-Kobalt-Komplex
CV	zyklische Voltammetrie (cyclic voltammetry)
DCM	Dichlormethan
ddab	Didodecyldimethylammonium-Bromid
DET	direkter Elektronentransfer
DME	Dimethylester
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
EBC	Atemkondensat (exhaled breath condensate)
ET	Elektronentransfer
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinucleotid, reduzierte Form
FeHRP	native Meerrettich Peroxidase
FMN	Flavinmononucleotid
GC	Glaskohlenstoff (glassy carbon)
GDH	Glucosedehydrogenase
HRP	Meerrettich Peroxidase (horseradish peroxidase)
HRP-I	Meerrettich Peroxidase Compound I
HRP-II	Meerrettich Peroxidase Compound II
HRP-III	Meerrettich Peroxidase Compound III
ITO	Indiumzinnoxid (indium tin oxide)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LDH	Laktatdehydrogenase
LOD	Laktatoxidase
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MeTMPP	Tetramethoxyphenylporphyrin-Metall-Komplex

MIX	Mesoporphyrin IX
MnCCP	mangansubstituierte Cytochrom c Peroxidase
MnCyt $b_5$	mangansubstituiertes Cytochrom $b_5$
MnHb	mangansubstituiertes Hämoglobin
MnHRP	mangansubstituierte Meerrettich Peroxidase
MnMb	mangansubstituiertes Myoglobin
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid, reduzierte Form
NHE	Normalwasserstoffelektrode (normal hydrogen electrode)
OEP	Octaethylporphyrin
OsHRP	osmiumsubstituierte Meerrettich Peroxidase
OsMb	osmiumsubstituiertes Myoglobin
PEI	Polyethylenimin
PG	pyrolytisches Graphit
PIX	Protoporphyrin IX
POD	Peroxidase
RDE	rotierende Scheibenelektrode (rotating disk electrode)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RT	Raumtemperatur
RuMb	rutheniumsubstituiertes Myoglobin
SCE	Standard Kalomel Elektrode (standard calomel electrode)
SG	spektroskopisches Graphit
SOD	Superoxiddismutase
THF	Tetrahydrofuran
TMB	Tetramethylbenzidin
TMPP	Tetramethoxyphenylporphyrin
TPP	Tetraphenylporphyrin
TTF	Tetrathiafulvalen
$k_1$	Geschwindigkeitskonstante der Oxidation von HRP zu HRP-I
$k_2$	Geschwindigkeitskonstante der Reduktion von HRP-I zu HRP-II
$k_3$	Geschwindigkeitskonstante der Reduktion von HRP-II zu HRP
$k_s$	heterogene Elektronentransfer-Geschwindigkeitskonstante der Reduktion von HRP-I zu HRP an einer Elektrode
$k_{ET}$	Elektronentransfer-Geschwindigkeitskonstante
$\hbar$	Plancksche Konstante ( $1,055 \times 10^{-34}$ Js)
$V_R$	elektronische Kopplung
(FC)	Franck-Condon-Faktor

$V_R^0$	maximale elektronische Kopplung
$\beta$	Exponentialkoeffizient der elektronischen Kopplung
$d$	kürzester Abstand zwischen den Zentren von je einem Kohlenstoffatom (bei Aromaten) von Elektronendonator und -akzeptor
$d_0$	Distanz für die Ausdehnung der $\pi$ -Elektronenorbitale über die Kohlenstoffkerne hinaus (etwa 0,3 nm)
$\Delta G^0$	Gibbs-Standardreaktionsenergie
$\lambda$	Reorganisationsenergie
$k_B$	Boltzmann Konstante ( $1,381 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$ )
T	Temperatur
I	Strom
$I_{\text{lim}}$	diffusionslimitierter Strom
$I_{\text{kin}}$	kinetisch limitierter Strom
$\omega$	Winkelgeschwindigkeit
c	Konzentration
F	Faraday Konstante ( $96485,309 \text{ Cmol}^{-1}$ )
D	Diffusionskoeffizient
$\nu$	kinematische Viskosität
m	milli ( $10^{-3}$ )
$\mu$	micro ( $10^{-6}$ )
n	nano ( $10^{-9}$ )
p	pico ( $10^{-12}$ )

## Umrechnungen

	von	nach	Umrechnung
<i>Potentiale bei verschiedenen Referenzelektroden</i>	Ag/AgCl/1M KCl	NHE	+ 0,237 V [1]
	SCE	NHE	+ 0,244 V [1]
	Fc/Fc <sup>+</sup>	Ag/AgCl	+ 0,35 V [2]
<i>Längen</i>	Å	nm	× 0,1

## **1. Einleitung**

Eine schnelle und zuverlässige Bestimmung von einzelnen Substanzen oder Substanzklassen spielt in der medizinischen Diagnostik und Therapie eine große Rolle. Ein bekanntes Beispiel ist die Bestimmung der Glucose-Konzentration im Blut von Diabetikern. Biosensoren eignen sich besonders zur Messung einzelner Substanzen in komplexen Proben wie Blut.

Laut IUPAC ist ein Biosensor "a self-contained integrated device, which is capable of providing specific quantitative or semi-quantitative analytical information using a biological recognition element (biochemical receptor) which is retained in direct spatial contact with a[...] transduction element. Because of their ability to be repeatedly calibrated, we recommend that a biosensor should be clearly distinguished from a bioanalytical system, which requires additional processing steps, such as reagent addition. A device which is both disposable after one measurement, i.e. single use, and unable to monitor the analyte concentration continuously or after rapid and reproducible regeneration should be designated a single-use biosensor" [3].

In der Praxis wird selten zwischen „echten“ Biosensoren und „Einweg“-Biosensoren unterschieden. In der Fachwelt wird daher ein Biosensor durch engen räumlichen Kontakt zwischen biologischem Erkennungselement und Transduktionselement, sowie durch die Generierung eines elektrischen Signals aus der Interaktion des Erkennungselements mit dem Analyten definiert [4]. Abbildung 1 zeigt ein allgemeines Schema eines Biosensors mit verschiedenen Erkennungs- und Transduktionselementen.

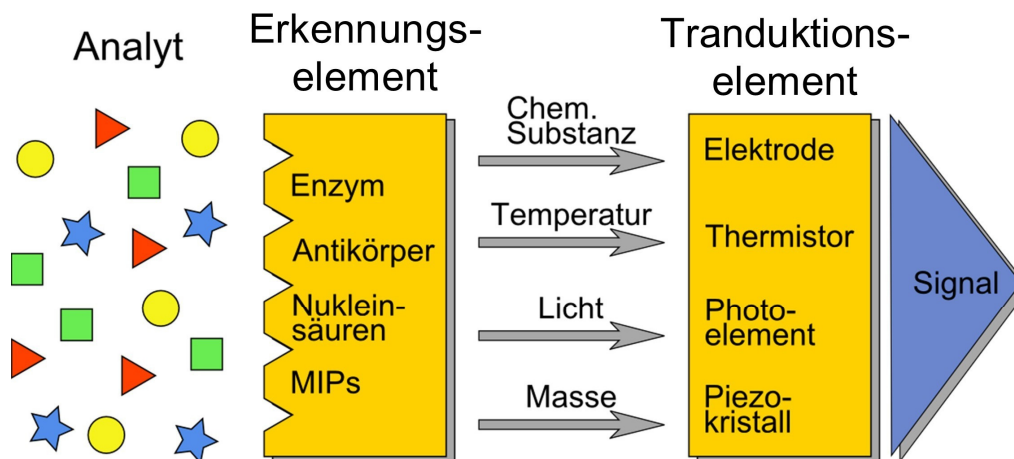


Abbildung 1 Schema eines Biosensors mit einer Auswahl an Erkennungs- und Transduktionselementen.

Unter biologischen Erkennungselementen versteht man dabei Enzyme, Antikörper, Rezeptoren, DNA, Zellfragmente, ganze Zellen oder auch Gewebe. Heutzutage werden auch immer mehr biomimetische Erkennungselemente wie Aptamere oder Molekulare Imprints verwendet. Die Verwendung von spezifischen Enzymen und Antikörpern macht eine

Messung von einzelnen Substanzen in komplexen Proben möglich. Mit Sensoren, die Zellen oder Gewebe als Erkennungselement einsetzen, können Summenparameter, wie die Toxizität oder der biologische Sauerstoffverbrauch, einer Probe bestimmt werden. Als Transduktionselemente dienen z.B. Elektroden, piezoelektrische Quarzkristalle, optisch transparente Materialien oder Feldeffekttransistoren.

### **1.1. Biosensoren**

Biosensoren können nach Funktion des biologischen bzw. biomimetischen Erkennungselements oder nach verwendetem Transducer klassifiziert werden. Erfolgt die Gruppierung nach der Art der Analyterkennung, so lassen sich die Biosensoren in Affinitätssensoren und katalytische Sensoren unterteilen [5, 6]. Bei einer Gruppierung nach dem Transducer lassen sich optische, elektrochemische, kalorimetrische und gravimetrische Sensoren unterscheiden.

#### **1.1.1. Affinitätssensoren**

Bei Affinitätssensoren erfolgt die Analyt-Erkennung durch Bindung an Antikörper, Rezeptoren, DNA, Aptamere oder Molekulare Imprints [6]. Die Bindung wird bevorzugt durch gravimetrische, kalorimetrische oder optische Methoden nachgewiesen [5].

Ein indirekter Nachweis der Bindung kann durch Zusatz von Markersubstanzen nach Art eines Immunoassays erfolgen [5]. Bei dieser Art von Sensoren erfolgt zwar die Analyt-Erkennung durch eine Bindung, der Nachweis, bzw. die Erkennung des Markers, aber katalytisch.

Der Unterschied zwischen Sensor und Assay besteht dabei darin, dass beim Sensor die biologische/biomimetische Komponente in unmittelbarer räumlicher Nähe des Transducers immobilisiert wird, während sie beim Assay auf einer neutralen Oberfläche aufgetragen und erst nach der Analyt-Bindung mit dem Transducer zusammengebracht wird.

#### **1.1.2. Katalytische Sensoren**

Bei katalytischen Sensoren wird der Analyt durch die biologische Komponente (Enzyme, Zellen oder katalytische Antikörper, Aptamere und Molekulare Imprints) umgesetzt, wobei ein detektierbarer Stoff entsteht oder verbraucht wird. Die dabei gebildete bzw. benötigte Wärme kann kalorimetrisch gemessen werden. Bei speziellen Analyt/Erkennungselement-Kombinationen kann durch den katalytischen Umsatz ein optisch detektierbarer Stoff entstehen. Die häufigste Detektionsmethode bei katalytischen Sensoren ist eine elektrochemische Messung. Eine wichtige Rolle unter den katalytischen Sensoren spielen die amperometrischen Enzym-Elektroden (Abschnitt 1.3).

Katalytische Erkennungselemente, vor allem Enzyme, ermöglichen auch eine empfindlichere Messung von Analyten, die ohne die biologische Komponente physikochemisch gemessen werden können. Die Verstärkung des Messsignals erfolgt dabei z. B. bei amperometrischen Enzym-Elektroden durch Wiederherstellung des bei der Messung umgewandelten Analyten.

### **1.1.3. Optische Sensoren**

Bei optischen Sensoren werden einer Reihe von verschiedenen Prinzipien angewandt. Optosensoren haben dementsprechend auch sehr verschiedene Formen. Im Allgemeinen wird Licht auf den Analyten eingestrahlt und eine Änderung in einer Eigenschaft des Lichts, z.B. der Intensität (Photometrie), der Wellenlänge (Fluorimetrie) oder des Reflektionswinkels (Reflektometrie), registriert [7]. Bei optischen Biosensoren kann die biologische Komponente am Ende eines Lichtleiters immobilisiert werden. Bei dieser Anordnung wird die gesamte Analytlösung zwischen Lichtquelle und Detektor durchleuchtet und die Summe aller Änderungen registriert. Um nur die Änderungen in unmittelbarer Nähe des Erkennungselements zu messen, wird die biologische Komponente an der Seite des Lichtleiters immobilisiert und mit ATR-Spektroskopie vermessen. Die Bezeichnung ATR steht für *attenuated total reflection* (deutsch: abgeschwächte Totalreflektion). Das Licht wird bei dieser Methode aufgrund von Totalreflektionen durch den Lichtleiter geleitet. Bei Totalreflektionen bildet sich hinter der reflektierenden Grenzfläche ein evaneszentes Feld aus, welches etwa eine Wellenlänge weit in das umgebende Medium hinein reicht. Wechselwirkungen im evaneszenten Feld, z.B. Absorptionen oder Anregungen von Fluoreszenz, beeinflussen die Intensität des reflektierten Lichts [8]. Eine bekannte Methode, die auf diesem Prinzip beruht und für Biosensoren eingesetzt wird, ist die Oberflächenplasmonresonanz. Dabei wird eine dünne Metallschicht auf ein Prisma aufgebracht. Im evaneszenten Feld bilden sich hier Oberflächenplasmonen, die das Licht in Abhängigkeit vom Einstrahlwinkel unterschiedlich stark absorbieren. Eine Änderung der Probe im evaneszenten Feld führt zu einer Veränderung der Oberflächenplasmonen, welche als eine Verschiebung des Winkels mit maximaler Absorption registriert wird.

### **1.1.4. Kalorimetrische Sensoren**

Ein Beispiel für einen kalorimetrischen Transducer ist der Thermistor. Bei dieser Methode wird die Wärme, die bei einer Bindung oder einem katalytischen Umsatz entsteht oder verbraucht wird, gemessen.

### **1.1.5. Gravimetrische Sensoren**

Für eine gravimetrische Bestimmung eignen sich piezoelektrische Quarzkristalle als Transduktionselemente [9]. Eine Massenzunahme durch die Bindung des Analyten wird hier

durch eine Änderung der Resonanzfrequenz angezeigt. Diese Art von Transducer eignet sich also besonders gut für Affinitätssensoren.

### **1.1.6. Elektrochemische Sensoren**

Die häufigste Transducerart bei katalytischen Sensoren sind Elektroden. Bei Verwendung entsprechender Marker können auch elektrochemische Affinitätssensoren hergestellt werden. Elektroden für Biosensoren können aus Kohlenstoff oder Edelmetallen (Gold, Silber, Platin) bestehen. Auch Halbleitermaterialien wie Indiumzinnoxid (ITO, engl. indium tin oxide) werden verwendet. Kohlenstoffelektroden bestehen aus Graphit (z.B. pyrolytisches Graphit, spektroskopisches Graphit), Glaskohlenstoff, Carbon Black oder einem Kohlenstoffkomposit (z.B. Kohlenstoffpaste).

Als Messprinzip werden amperometrische, potentiometrische, konduktometrische, voltammetrische und andere Methoden verwendet [10]. Bei amperometrischen Messungen wird eine konstante Spannung zwischen der Arbeitselektrode (Biosensor) und einer Referenzelektrode angelegt und der resultierende Strom gemessen. Bei der Potentiometrie wird die Spannung zwischen dem Biosensor und einer Referenzelektrode gemessen. pH-Wert-Messungen beruhen auf diesem Prinzip. Bei der Konduktometrie wird der Widerstand bzw. die Leitfähigkeit der Erkennungselementschicht und der Probenlösung bestimmt. Bei voltammetrischen Messungen wird der Strom in Abhängigkeit von der angelegten Spannung aufgezeichnet. Eine wichtige Rolle unter den elektrochemischen Sensoren spielen die amperometrischen Enzym-Elektroden (Abschnitt 1.3).

## **1.2. Immobilisierungsverfahren**

Für die Immobilisierung der biologischen Komponente auf dem Transducer werden verschiedene Verfahren verwendet, die von einfacher Adsorption bis zur kovalenten Kopplung reichen [11, 12].

### **1.2.1. Adsorption**

Proteine und Nukleinsäuren können auf der Transduceroberfläche adsorbieren, wobei van-der-Waals-Kräfte, ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken,  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkungen und/oder hydrophobe Wechselwirkungen die Erkennungselemente an die Transduceroberfläche binden [13]. Die Bindungskräfte sind im Allgemeinen schwach, reichen aber für eine mäßige Immobilisierung aus. Eine Adsorption ist einfach und schnell durchführbar und benötigt keine zusätzlichen Materialien. Allerdings kann die biologische Komponente aufgrund der nur schwachen Bindung wieder abgelöst werden. Ein Bewegung der Messlösung (im Fließsystem, durch Rühren) oder Kontakt mit festen Substanzen kann die Desorption beschleunigen. Auch Änderungen im pH, in der Temperatur oder der



Ionenstärke der Umgebungslösung können die Desorption beeinflussen [14]. Weiterhin können Proteine durch Adsorption in der Struktur verändert werden und ggf. denaturieren [14].

### **1.2.2. Einschluss**

Durch Einschluss der Proteine und Nukleinsäuren in ein Gel, eine Polymermatrix oder hinter eine semipermeable Membran kann eine Strukturänderung verhindert werden [15, 16]. Bei diesen Verfahren bleiben die biologischen Komponenten in Lösung, werden aber in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt und dadurch auf der Transduceroberfläche gehalten. Die Porengröße der Polymermatrix oder der semipermeablen Membran (z.B. Dialysemembran) sollte so gewählt werden, dass die Proteine und Nukleinsäuren nicht durchdiffundieren können, aber Analyten und eventuelle Katalyseprodukte oder Cofaktoren frei beweglich sind. Gele (z.B. Gelatine, Agar) können mit der biologischen Komponente vermischt und dann auf die Transduceroberfläche aufgebracht werden. Bei Verwendung von Polymeren zur Immobilisation können die Monomere in Gegenwart vom Erkennungselement direkt auf dem Transducer polymerisiert werden. Polymere, Membranen und andere filmbildende Substanzen können auch über das durch Adsorption immobilisierte Erkennungselement aufgebracht werden und so eine Desorption verhindern. Eine weitere Variante ist die Verwendung von elektrisch leitenden Polymeren bei elektrochemischen Transducern. Die Polymermatrix kann dabei als Mediator zwischen Erkennungselement und Elektrode fungieren.

### **1.2.3. Kovalente Kopplung**

Bei einer kovalenten Kopplung wird eine chemische Bindung zwischen Erkennungselement und Transducer ausgebildet [11, 12]. Dabei werden funktionelle Gruppen des Proteins oder der Nukleinsäure meist über ein Linkermolekül an funktionelle Gruppen an der Transduceroberfläche geknüpft. Die meisten Transducermaterialien (Glas, Kohlenstoff, Metall) müssen dafür zunächst aktiviert werden, wobei vor allem Hydroxyl- (-OH), Carboxyl- (-COOH), Sulfhydryl- (-SH) und Amino- (-NH<sub>2</sub>) Gruppen auf der Oberfläche entstehen. Bei Proteinen können diverse natürliche Aminosäurereste als funktionelle Gruppen dienen. Durch rekombinante Techniken können aber auch künstlich Aminosäurereste verändert oder eingefügt werden um als Anker-Gruppe zu dienen. Bei Nukleinsäuren kann bei der Synthese am 3' oder 5' Ende eine funktionelle Gruppe angehängt werden.

Eine kovalente Kopplung hat den Vorteil, dass die Bindung sehr stabil ist. Bei den meisten Kopplungsverfahren besteht aber die Gefahr, dass das aktive Zentrum eines Enzyms oder die Bindungsstelle eines Antikörpers an die Oberfläche gebunden wird und so das Erkennungselement deaktiviert wird. Eine Variante der kovalenten Kopplung von Proteinen

ist das Crosslinking. Bei dieser Methode werden bereits immobilisierte Proteine durch bifunktionelle Reagenzien miteinander und mit der Oberfläche vernetzt und dadurch weiter stabilisiert. Durch Crosslinking kann ein Protein-Netzwerk gebildet werden, im Gegensatz zu der bei einer einfachen kovalenten Kopplung entstehenden Monoschicht.

### 1.3. Amperometrische Enzym-Elektroden

Bei amperometrischen Enzym-Elektroden wird ein Redoxenzym auf einer Elektrode immobilisiert und ein Potential angelegt. Der Analyt wird vom Enzym in einer Redoxreaktion spezifisch umgesetzt. Als zweiter Redoxpartner dient in der Gesamtreaktion die Elektrode.

Redoxenzyme, oder Oxidoreduktasen, bilden die erste der sechs Enzymklassen. Sie katalysieren allgemein die Übertragung von Redoxäquivalenten zwischen Substanzen. Zu den Oxidoreduktasen gehören Dehydrogenasen (z.B. Glucosedehydrogenase, Laktatdehydrogenase), Oxidasen (z.B. Glucoseoxidase, Laktatoxidase), Peroxidasen (z.B. Meerrettich Peroxidase, Cytochrom c Peroxidase), Reduktasen (z.B. Cytochrom c-Reduktase, Nitrit-Reduktase), Mono- und Dioxygenasen (z.B. Cholesterol-Monooxygenase, Prostaglandin H-Synthase).

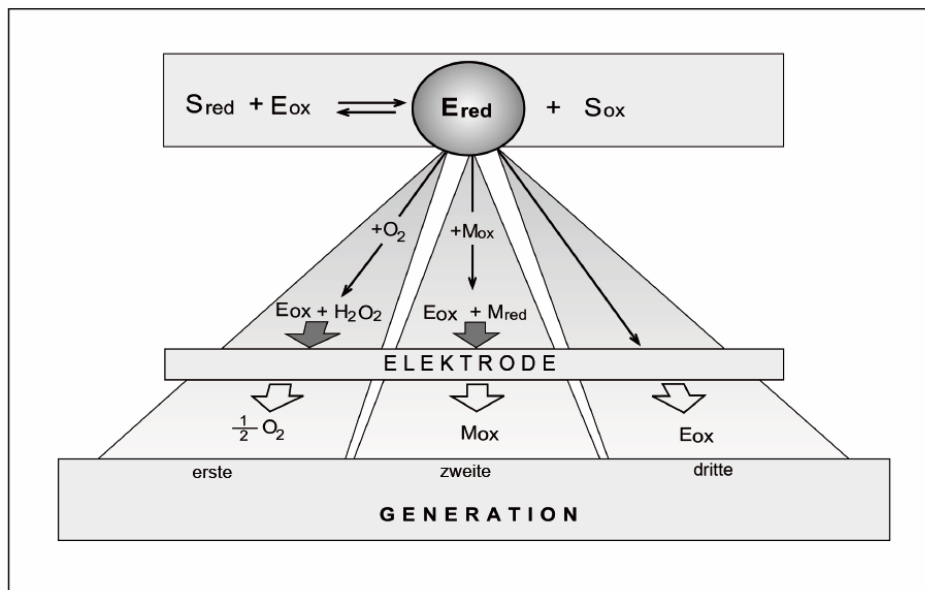


Abbildung 2 Die drei verschiedenen Generationen von Enzym-Elektroden (aus [17]).

Die Entwicklung der amperometrischen Enzym-Elektroden erfolgte in drei wesentlichen Schritten (Abbildung 2) [18, 19]. Bei den ersten Enzym-Elektroden wurde ein Sauerstoff verbrauchendes und meist Wasserstoffperoxid produzierendes Enzym zwischen zwei Membranen eingeschlossen, die vor eine Elektrode gespannt wurden. Meist wurde dabei eine Platin-Elektrode mit Ag/AgCl-Referenz verwendet, die bei einer Spannung von -0,6 V O<sub>2</sub> reduzieren und bei +0,6 V H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidieren kann.

Da die Sauerstoff-Konzentration einer Probe schwer kontrollierbar ist, wurden in der zweiten Generation O<sub>2</sub>-unabhängige Enzym-Elektroden entwickelt. Hier erfolgt der Elektronentransfer zwischen Enzym und Elektrode über einen Mediator, welcher co-immobilisiert oder der Analyt-Lösung zugegeben wird. Für die Herstellung von Enzym-Elektroden dieser Art werden neben Platin-Elektroden auch Gold-, Silber und Kohlenstoffelektroden verwendet. Die Immobilisierung des Enzyms auf der Elektrode wird durch unterschiedliche Methoden erreicht (siehe Abschnitt 1.2). Als Mediator kann jeder redoxaktive Stoff dienen, der vom Enzym umgesetzt werden kann. Eine Übersicht über geeignete Mediatoren und ihre Redoxpotentiale wurde 1982 von M. L. Fultz und R. A. Durst zusammengestellt [20]. Die meisten der genannten Mediatoren sind in wässrigen Medien löslich und müssen bei einer Messung der Probe zugegeben werden. Einige Mediatoren, z.B. unlösliche niedermolekulare Substanzen oder Redoxpolymere, können auch mit dem Enzym co-immobilisiert werden. Unlösliche Mediatoren können auf der Elektrode adsorbiert werden ohne dass sie bei Messungen in wässrigen Proben desorbieren. Redoxpolymere [21, 22] können selbst als Immobilisierungsagens dienen, wodurch eine zusätzliche Immobilisierung unnötig wird. Bei solchen „reagenzfreien“ Biosensoren muss der Probe vor der Messung kein Mediator mehr zugesetzt werden. Auch können Enzyme, die kein Sauerstoff als Substrat haben, für diese Art von Biosensoren verwendet werden, wodurch die Auswahl an möglichen Enzymen stark vergrößert wurde. Ein weiterer Vorteil der Enzym-Elektroden zweiter Generation ist ein längerer Messbereich und eine verbesserte Selektivität.

Enzym-Elektroden der dritten Generation sind grundsätzlich „reagenzfrei“. Bei diesen Biosensoren besteht ein direkter Elektronentransfer zwischen Enzym und Elektrode. Dadurch entfällt die Notwendigkeit eines Mediatorzusatzes völlig. Diese Methode bleibt aber gegenwärtig auf solche Enzyme beschränkt, deren aktives Zentrum für Wechselwirkungen mit Oberflächen zugänglich ist.

### **1.4. Anwendung von Biosensoren**

Der größte Markt für kommerzielle Biosensoren sind Blutglucose-Messgeräte für die Diagnose und Behandlung von Diabetes. Etwa 4 % der Bevölkerung in den Industrieländern ist von dieser Krankheit betroffen und es werden Geräte entwickelt, die immer weniger Blut (weniger als 1 µl) für eine Messung benötigen und immer länger ohne Kalibrierung akkurate Ergebnisse liefern (Messergebnis innerhalb von Sekunden) [4]. Weitere klinisch relevante Marker, die mit Biosensoren bestimmt werden können, sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Ein weiteres Einsatzgebiet für Biosensoren ist die Umweltanalytik. Hier werden sie zum Nachweis von Pestiziden, wie Organophosphate, und anderen Giftstoffen eingesetzt. Auch zur Bestimmung des biologischen Sauerstoffverbrauchs (BOD, engl. Biological oxygen demand) oder zum Nachweis von bestimmten Bakterien können Biosensoren verwendet

werden [6]. Bei BOD-Sensoren werden meist Mikroorganismen in einer Membran vor einer Sauerstoff-Elektrode immobilisiert und der Sauerstoffverbrauch gemessen.

Analyt	Biologische Komponente	Normalbereich
Glucose	Glucoseoxidase	< 140 mg/dl (Plasma)
	Glucosedehydrogenase	
	(GDH) + Hexokinase	
	Pyrrlochinolin-Chinon abhängige GDH	
glykiertes Hämoglobin	Antikörper	4 – 7 %
Folsäure	Antikörper	> 5 nM (Serum)
	Folate binding protein	283 – 1360 nM (Erythrocyten)
Ascorbinsäure	Ascorbatoxidase	0,6 – 2,0 mg/dl (Serum)
Cholesterin	Cholesterinoxidase	100 – 210 mg/dl
Kreatinin	Kreatinindeiminase	bis 1,2 (m) / 1,1 (w) mg/dl (Serum)
	Kreatininase + Kreatinase	1 – 2 (m) / 0,8 – 1,8 (w) g/Tag (Urin)
	+ Sarcosinoxidase	
Laktat	Laktatoxidase	0,5 – 2,2 mmol/l (venöses Plasma)
	Laktatdehydrogenase	0,5 – 1,6 mmol/l (arterielles Plasma)
Triglyceride	Lipasen	bis 250 mg/l
Harnstoff	Urease	5 – 20 mg/dl (Harnstoff-Stickstoff)
Harnsäure	Uricase	3,4 – 7,0 (m) / 2,4 – 6,0 (f) mg/dl (Serum)
		250 – 750 (f) / – 800 (m) mg/Tag (Urin)
Phosphat	Phosphate binding protein	0,81 – 1,45 mmol/l (Serum)
	Pyruvatoxidase	

Tabelle 1 Auswahl an klinisch relevanten Markern, die mit Biosensoren bestimmt werden können [23].

In der Lebensmittelanalytik werden Biosensoren zur Qualitätsprüfung von Fleisch und Fisch, zur Bestimmung von Lebensmittel-Komponenten oder zum Nachweis von Giftstoffen eingesetzt [6]. Bei der Qualitätsprüfung von Fleisch wird meist die Putrescin- und Cadaverin-Konzentration bestimmt. Als biologische Komponente dient dabei z. B. die Putrescinoxidase [6]. Hypoxanthin kann als Indikator für die Qualität von Fisch dienen und mit Xanthinoxidase-Sensoren gemessen werden [6]. Andere in der Lebensmittelanalytik bestimmte Substanzen sind diverse Zucker, z.B. Glucose oder Lactose.

In der Industrie werden Biosensoren bei der Überwachung von Bioreaktoren angewendet. Einige Sensoren messen die Konzentration von Nährstoffen, wie Glucose. Andere werden

zur Überwachung der Produkt-Bildung, wie Penicillin, verwendet. Bei Fermentationsprozessen werden weiterhin die Ethanol- und Laktat-Konzentrationen beobachtet.

Es werden immer mehr Biosensoren mit neuen Erkennungselementen entwickelt, was das Einsatzgebiet der Biosensoren erweitert. Neue Transducermaterialien und Immobilisierungsverfahren führen zu empfindlicheren und stabileren Sensoren. Durch Miniaturisierung und Automatisierung der Technik können kleine, einfach handhabbare Geräte gebaut werden, mit denen eine schnelle Messung direkt vor Ort durchgeführt werden kann. In der Medizin führt eine solche Point-of-Care Diagnostik für Patienten zu einer schnelleren Behandlung und somit oft zu besseren Genesungschancen und kürzeren Krankenhausaufenthalten.

Bei Qualitätskontrollen, z.B. in der Lebensmittelindustrie, können solche Messgeräte eine aufwendige Sammlung von Proben und den Transport in ein Labor vermeiden. Weiterhin können eventuell kontaminierte Lebensmittel sofort aus dem Verkehr gezogen werden.

Biomimetische Sensoren, z.B. mit Molekularen Imprints, ermöglichen auch Messungen in bisher nicht oder nur schwer zugänglichen Medien. Die meisten Proteine denaturieren bei hohen Temperaturen und sind bei niedrigen Temperaturen wenig aktiv. Einige Enzyme sind in organischen Lösungsmitteln begrenzt aktiv, andere denaturieren schnell. Molekulare Imprints sind auch bei extremen Temperaturen oder in organischen Lösungsmitteln stabil. Dadurch können biomimetische Sensoren auch unter für biologische Systeme extremen Bedingungen noch zuverlässige Messergebnisse liefern.

## **2. Zielstellung**

In dieser Arbeit wurden drei Aspekte der Biosensorik anhand von Enzym-Elektroden mit Meerrettich Peroxidase (engl. horseradish peroxidase, HRP) als Biokomponente näher untersucht und weiterentwickelt. Im Mittelpunkt stand dabei die Analytik von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) in biologischen Medien. Die untersuchten Ansatzpunkte waren (A) die Anwendung des Sensors, (B) der Transducer, d.h. das Elektrodenmaterial und (C) das Enzym selbst.

Im ersten Teil (A) wurde ein bereits kommerziell erhältlicher  $H_2O_2$ -Analysator, welcher eine HRP-Elektrode als Sensor enthält, in zwei Vorstudien erprobt. Ziel hierbei war, neue Anwendungsgebiete der  $H_2O_2$ -Analytik und die davon abzuleitenden Anforderungen an die HRP-Elektroden zu finden. In einer klinischen Pilotstudie wurde untersucht, ob  $H_2O_2$  im Atemkondensat bzw. in der Ausatemluft ein geeigneter Parameter für eine nicht-invasive Verlaufskontrolle der Chemotherapie von Brustkrebs-Patientinnen ist. In einer anderen Vorstudie wurde überprüft, ob eine Messung von ausgeatmetem  $H_2O_2$  bei der Bestimmung der anaeroben Schwelle und der Trainingsüberwachung in der Sportmedizin aussagefähig ist. Bei beiden Studien wurden zusätzlich die Laktat-Konzentrationen in Atemluft und Blut mit ermittelt.

Im Teil B wurde nach neuen Elektrodenmaterialien gesucht. Ziel dieser Suche war eine Erhöhung der Elektronentransferrate vom Elektrodenmaterial zum Enzym. Wie in Abschnitt 3.3.1 noch näher erläutert wird, ist ein kurzer Abstand zwischen Enzym und Elektrode eine entscheidende Voraussetzung für einen schnellen Elektronentransfer. Als ein hochporöses Kohlenstoffmaterial war pyrolysiertes Kobalt-Tetramethoxyphenylporphyrin (CoTMPP) mit verschiedenen Zusatzstoffen ein viel versprechender Ansatzpunkt.

Im dritten Teil (C) wurde schließlich die Peroxidase selbst näher betrachtet. Im speziellen wurde hier untersucht, inwiefern sich elektrochemische und peroxidatische Eigenschaften durch Austausch des Eisen-Zentralatoms im aktiven Zentrum durch Osmium verändern.

### **3. Theoretische Grundlagen**



### 3.1. Meerrettich Peroxidase

Peroxidasen (PODs) sind Oxidoreduktasen, die verschiedenste Substanzen (SH) oxidieren, wobei sie Hydroperoxide (RO<sub>2</sub>H), sowohl Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) als auch organische Hydroperoxide, als Elektronenakzeptor verwenden (Gleichung 1). Sie sind ubiquitär in der Tier- und Pflanzenwelt und unter den Mikroorganismen vertreten. Da die meisten Peroxidasen sehr unspezifisch in Bezug auf den Elektronendonator sind, werden sie oft nach ihrer Quelle benannt. Beispiele hierfür sind die Peroxidasen aus Meerrettich, Erdnuss und Tabak. Einige PODs, wie die Cytochrom c Peroxidase, haben charakteristische Elektronendonoren und wurden dementsprechend nach ihren Substraten bezeichnet [24-26].



Die Meerrettich Peroxidase (engl. horseradish peroxidase, HRP; E.C. 1.11.1.7; Abbildung 3) ist eine der am besten charakterisierten Peroxidasen. Das Glycoprotein enthält, wie auch die meisten anderen PODs, ein Eisen-Protoporphyrin IX (Häm; Abbildung 4), welches nicht-kovalent gebunden ist und am Ende eines etwa 1 nm langen Kanals liegt, durch das die Substrate zum aktiven Zentrum gelangen [27, 28].

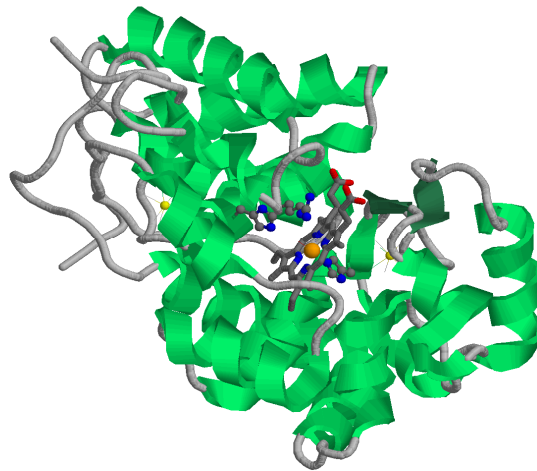


Abbildung 3 3D-Struktur der Meerrettich Peroxidase (Protein Data Bank, [29]).

Die HRP kommt in vielen Formen vor, die sich in saure, neutrale und basische Isoenzyme einteilen lassen [25, 26]. Kommerziell erhältliche HRP-Präparationen enthalten hauptsächlich Isoenzym C, eine neutrale bis leicht basische Form.

Die HRP besteht aus 308 Aminosäure-Resten, einem Häm, um 20 % Kohlenhydrate und zwei Ca<sup>2+</sup>-Ionen [25, 30]. Das Enzym hat ein Molekulargewicht von etwa 42 kDa und Dimensionen von etwa 6,2 × 4,3 × 1,2 nm<sup>3</sup> [25, 31].

Im Grundzustand liegt das Eisen des Häms in dreiwertiger Form vor (Abbildung 5, HRP) [24, 25, 32, 33]. Das Eisen ist hier pentakoordiniert, wobei neben den vier Stickstoffliganden des Porphyrinrings der fünfte Ligand, ebenfalls ein Stickstoffatom, vom Histidin H170 stammt.

Das Eisen liegt im Grundzustand nicht genau in der Porphyrin-Ebene, sondern ist etwas auf die Seite des Histidins verschoben [32].

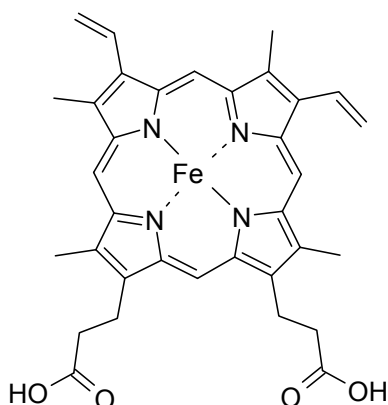


Abbildung 4 Struktur des Protophyrin IX-Eisen-Komplexes.

Peroxide, vor allem  $\text{H}_2\text{O}_2$ , oxidieren den Grundzustand zu Compound I (HRP-I), einem  $\pi$ -Kationradikal mit einem Oxyferryl-Eisen ( $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ). Fünf der sechs Liganden des Eisens entsprechen denen im Grundzustand. Der sechste Ligand, das Sauerstoff des Oxyferryl-Eisens, wird durch Arginin R38 und durch ein Wassermolekül stabilisiert. Das Wassermolekül wird weiterhin durch Histidin H42 und Prolin P139 stabilisiert [32]. Im hexakoordiniertem Zustand sitzt das Eisen in der Porphyrin-Ebene [32]. Die Reaktion vom Grundzustand zu HRP-I wird durch die Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  und das Redoxpotential  $E'_0(\text{HRP}/\text{HRP-I})$  charakterisiert. Bei pH 7,0 und  $25^\circ\text{C}$  hat  $k_1$  für  $\text{H}_2\text{O}_2$  den Wert  $1,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [34, 35]. Das Redoxpotential  $E'_0(\text{HRP}/\text{HRP-I})$  beträgt bei  $25^\circ\text{C}$   $0,869 \pm 0,002 \text{ V}$  (NHE) [36].

Die HRP-I wird dann über Compound II (HRP-II) in zwei aufeinander folgenden Elektronentransferschritten zurück zum Grundzustand reduziert, wobei das erste Elektron auf das Radikal und das zweite auf das Eisen übertragen wird (Abbildung 5). Der Sauerstoff in der HRP-II wird im Vergleich mit HRP-I zusätzlich durch ein Proton stabilisiert [32]. Die Elektronen für die Reduktion der HRP-I werden durch Elektronendonoren-Substrate (SH), wie verschiedene Phenole oder aromatische Amine, bereitgestellt. Die Reaktion von HRP-I zu HRP-II wird durch die Geschwindigkeitskonstanten  $k_2$  und das Redoxpotential  $E'_0(\text{HRP-I}/\text{HRP-II})$ , die Reaktion von HRP-II zum Grundzustand durch  $k_3$  und  $E'_0(\text{HRP-II}/\text{HRP})$  charakterisiert. Bei pH 7,0 und  $25^\circ\text{C}$  beträgt  $k_3$  für Guaiacol  $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und für Ferrocyanid  $7,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [34].  $E'_0(\text{HRP-I}/\text{HRP-II})$  beträgt bei  $25^\circ\text{C}$   $0,898 \pm 0,003 \text{ V}$  (NHE) [36].

Ein großer Überschuss an Peroxid führt zur Bildung von Compound III (HRP-III) [24, 25]. Die Bildung von HRP-III ist ein Schutzmechanismus vor einer „Selbstmord“-Inhibierung durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  [24].

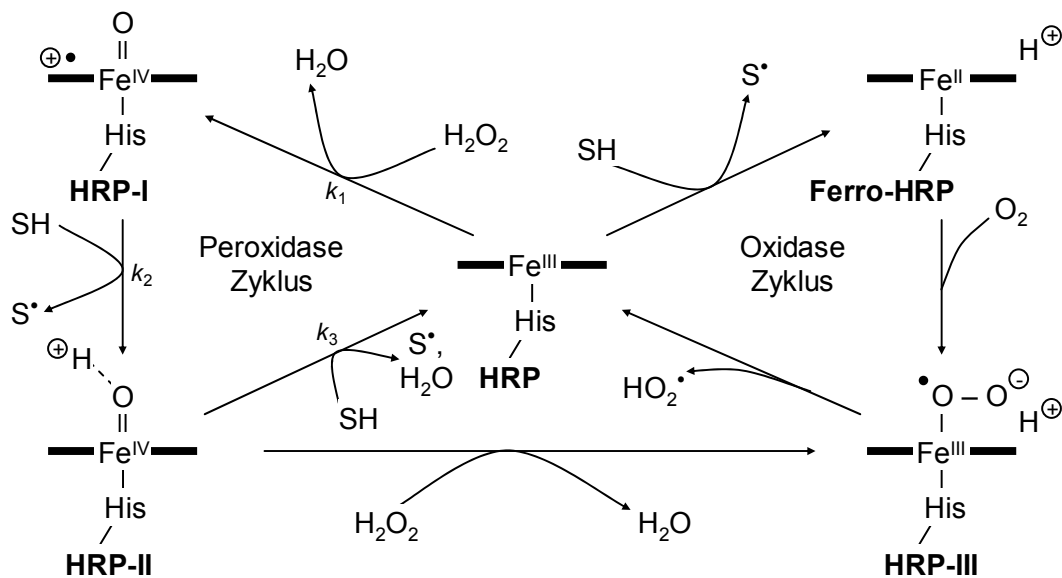


Abbildung 5 Die fünf Redoxzustände der Meerrettich Peroxidase (nach [32]).

Neben der Peroxiden kann HRP unter bestimmten Bedingungen auch Substanzen wie Isobutyraldehyd, Dihydroxyfumarat oder Indolacetat durch molekularen Sauerstoff oxidieren [24, 25, 37-40]. HRP-III ist ein Intermediat im Reaktionsmechanismus dieser Oxidationen.

Ein weiterer Redoxzustand der HRP ist die Eisen(II)-Form (Ferro-HRP) (Abbildung 5). Diese Form entsteht durch Reduktion des Grundzustandes durch starke Reduktionsmittel, wie z.B. Dithionit, oder durch eine Elektrode. Das Redoxpotential des  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ -Paares beträgt bei der nativen HRP -0,26 V (NHE) [34].

### 3.2. Teil A: Medizinische Anwendung

#### 3.2.1. HRP-Elektroden und ihre Anwendung

Peroxidase modifizierte Elektroden können zur Bestimmung von Wasserstoffperoxid, organischen Hydroperoxiden, Phenolen, aromatischen Aminen oder schädlichen Substanzen, z.B. Kaliumcyanid, verwendet werden (Abbildung 6). Peroxide, Phenole und Amine sind dabei Substrate der HRP. Andere Substanzen wie Kaliumcyanid sind Inhibitoren der Peroxidase-Reaktion. In Verbindung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzierenden Enzymen werden HRP-Elektroden auch zur Messung von anderen Substanzen, wie Glucose (HRP und Glucoseoxidase) oder Laktat (HRP und Laktatoxidase), eingesetzt [19, 33].

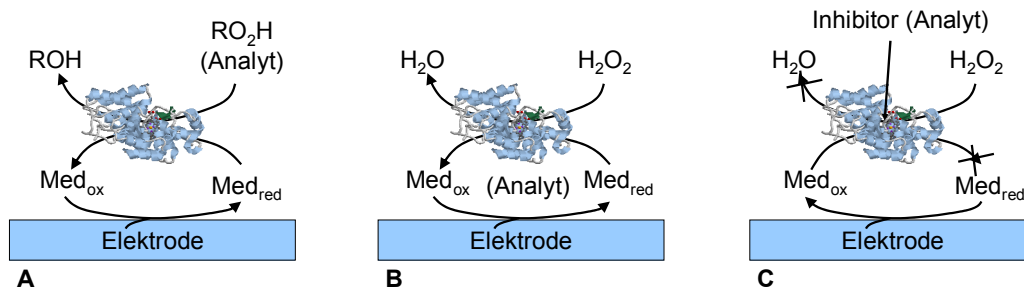


Abbildung 6 Anwendung von HRP-Elektroden (A) Messung von Peroxid, (B) Messung von Mediator, (C) Messung von Inhibitor.

Die Detektion von Inhibitoren erfolgt durch die Registrierung einer Abnahme des Signals bei Zugabe des Inhibitors (Abbildung 6C). Elektroden nach diesem Prinzip wurden unter anderem zur Bestimmung von Cyanid, Fluorid, 2-Mercaptoethanol und Thioharnstoff entwickelt [33, 41].

Phenole und Amine können oft direkt an der Elektrode gemessen werden (Abbildung 6B). In Gegenwart von HRP und  $\text{H}_2\text{O}_2$  können diese Substanzen zwischen HRP und Elektrode oxidiert und wieder zurückreduziert werden. Durch diesen Recycling-Vorgang wird das Messsignal amplifiziert und auch kleine Analyt-Konzentrationen können noch gut gemessen werden. Beispiele hierfür sind HRP-Elektroden zur Bestimmung von *p*-Aminophenol, Anilin und *p*-Cresol [33, 42].

Meist werden HRP-Elektroden zur Messung von Peroxiden, vor allem  $\text{H}_2\text{O}_2$ , eingesetzt (Abbildung 6A). Aber auch organische Hydroperoxide können mit HRP-Elektroden bestimmt werden, darunter Butanonperoxid, Cumolhydroperoxid, Triphenylmethylhydroperoxid, und *tert*-Butylhydroperoxid [43, 44].

Verschiedene Elektrodenmaterialien, Immobilisierungsarten und Mediatoren wurden im Laufe der Jahre untersucht. Dabei wurden Detektionslimits von bis zu 10 nM für  $\text{H}_2\text{O}_2$

erreicht [19, 22, 33, 45-49]. Der Funktionsmechanismus der HRP-Elektroden wird im Abschnitt 3.3.1 erklärt.

### 3.2.2. Wasserstoffperoxid in biologischen Systemen

Als ein relativ stabiler Vertreter der Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) ist Wasserstoffperoxid gut zur Bestimmung dieser Substanzklasse geeignet. Weitere Vertreter der ROS sind eine Reihe von freien Radikalen, wie Superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ), Hydroxylradikal ( $OH^{\cdot}$ ) oder Peroxylradikal ( $RO_2^{\cdot}$ ) und nicht radikalische Spezies, wie Ozon ( $O_3$ ), oder Hydroperoxide ( $RO_2H$ ).

Eine Quelle für reaktive Sauerstoffspezies in biologischen Systemen ist die aerobe Zellatmung. Hierbei werden über eine Reihe von membrangebundenen und löslichen Elektronencarriern insgesamt vier Elektronen von einem Elektronendonator (NADH oder  $FADH_2$ ) auf molekularen Sauerstoff ( $O_2$ ) übertragen. Die Elektronencarrier (Flavoproteine, Eisen-Schwefel-Proteine, Ubichinon und Cytochrome) haben Redoxpotentiale zwischen -0,320 und +0,380 V und sind in vier Komplexen angeordnet (Abbildung 7) [50].

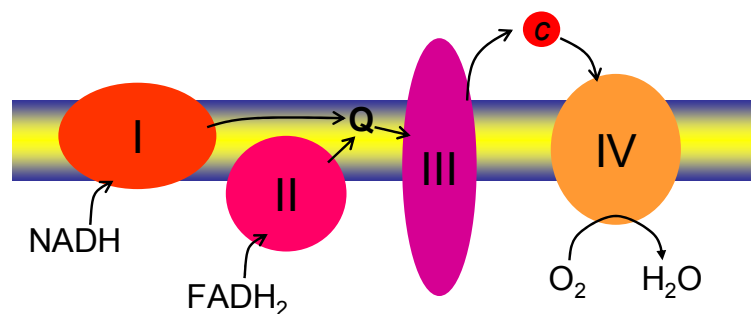
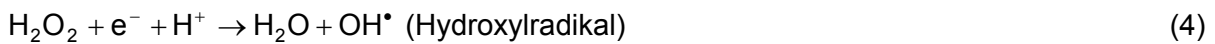
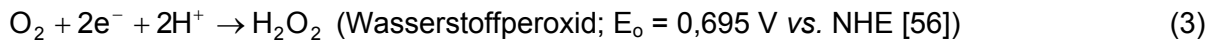
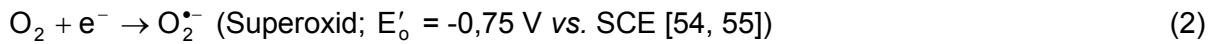


Abbildung 7 Mitochondriale Atmungskette mit Komplex I bis Komplex IV, Ubichinon (Q) und Cytochrom c (c) (nach [51, 52]).

Die Elektronen werden von Reduktionsäquivalenten (NADH und  $FADH_2$ ) über Komplex I oder Komplex II in die Atmungskette eingespeist, zunächst durch Ubichinon auf Komplex III und dann durch Cytochrom c auf Komplex IV übertragen, wo schließlich Sauerstoff zu Wasser ( $H_2O$ ) reduziert wird. Eine unvollständige Übertragung der Elektronen führt zur Bildung von unterschiedlichen ROS (Gleichungen 2 - 4). Auch wenn thermodynamisch die Bildung von Superoxid an jedem der Komplexe möglich ist, konnten in isolierten Mitochondrien nur zwei ROS bildende Stellen identifiziert werden [50]. Superoxid kann an Komplex III gebildet werden, wobei Ubisemichinon, die halb-reduzierte Form des Ubichinons, als Elektronendonator dient [53]. Die andere ROS bildende Stelle der Atmungskette liegt im Komplex I [52]. Die Superoxid-Bildung am Komplex III wird allerdings meist durch den Komplex III-Inhibitor Antimycin A induziert [50, 53]. Liu *et al.* zeigten, dass der primäre

physiologisch und pathologisch relevante ROS Bildungsort die Flavinmononucleotid (FMN)-Gruppe des Komplex I ist [50]. Ähnliche Reaktionen können auch während der pflanzlichen und bakteriellen Photosynthese oder bei anderen biologischen Redoxreaktionen stattfinden und zur Bildung von ROS führen.



Das Superoxid kann spontan oder katalysiert durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2$  dismutieren (Gleichung 5). Die spontane Dismutation hat bei pH 7,5 eine Geschwindigkeitskonstante von  $2,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [57] und wird durch die SOD auf  $2 - 4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  erhöht [58].



$\text{H}_2\text{O}_2$  wird durch Katalasen (Cat) und Peroxidasen (POD) aus lebenden Systemen entfernt (Gleichungen 6, 7).



Eine schnelle Zerstörung von reaktiven Sauerstoffspezies ist nötig, um größere Zellschäden zu verhindern. ROS, vor allem radikalische ROS, wie  $\text{O}_2^{\bullet-}$  oder  $\text{OH}^{\bullet}$ , reagieren gut mit anderen Molekülen, darunter DNA, Proteine und Lipide. Die Reaktionsprodukte sind oft inaktiv oder in ihrer Eigenschaft verändert, was zu Erkrankungen, wie z.B. Krebs, oder einfach zu diversen Alterungserscheinungen führen kann.

Tatsächlich wird die zytotoxische Wirkung der ROS von Tieren und Pflanzen gezielt zur Schädigung und Vernichtung von viralen und bakteriellen Pathogenen eingesetzt.

Eine wichtige Rolle dieses gezielten Einsatzes von ROS spielt die Familie der NADH-Oxidasen [59, 60]. Bei der Immunabwehr besitzen vor allem die Neutrophilen diese Enzymsysteme.

### 3.2.3. Atemkondensat

Die Ausatemluft enthält neben gasförmigen Bestandteilen auch eine Aerosolfraction und vor allem Wasserdampf [61]. Durch Kondensation lassen sich diese Anteile in flüssiger Form sammeln. Dieses Atemkondensat (engl. exhaled breath condensate, EBC) besteht zwar hauptsächlich aus Wasser, enthält aber auch eine Vielzahl an chemischen und biochemischen Komponenten. Diese Komponenten machen das EBC zu einer interessanten Quelle für mögliche biochemische Informationen aus der Lunge. Da die Gewinnung außerdem, im Gegensatz zu den bisher in der medizinischen Diagnostik eingesetzten

Methoden wie die bronchoalveoläre Lavage (BAL) oder das induzierte Sputum, völlig nicht-invasiv ist, hat die Untersuchung des EBCs in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen.

Bei der Kondensation lösen sich gasförmige Stoffe, wie Stickstoffmonoxid [62] oder Ammoniak [63], im Wasser. Andere Stoffe, wie Proteine oder DNA sind in der Aerosolfraction gelöst und kommen so ins EBC [64]. Das Aerosol entsteht aus der extrazellulären Flüssigkeit auf der Epithelschicht der Atemwege und Alveolen.

Speichel enthält ebenfalls diagnostisch interessante Marker, wie Antikörper, Nukleinsäuren, Hormone und andere Stoffe (Alkohol, Drogen) [65], gehört aber nicht zum Atemkondensat. Bei der Gewinnung von EBC sollte also darauf geachtet werden, dass die Probe nicht durch Speichel kontaminiert wird. Durch Messung der Amylase-Aktivität kann die Probe auf eine Kontamination durch Speichel überprüft werden. Bei den meisten publizierten Studien wurden die Proben auf Amylase-Aktivität getestet und es wurde keine Kontamination gefunden [66].

Neben der Amylase enthält Speichel noch eine Reihe von anderen Enzymen, darunter Proteasen, DNAsen und Lipasen, die eventuelle Marker aus Protein, DNA oder Lipid im EBC zerstören können [67]. Peroxidasen (Lactoperoxidase, Speichelperoxidase) sind ebenfalls im Speichel vorhanden [68, 69], so dass eine Speichelkontamination im EBC auch  $H_2O_2$  zerstören kann.

Die Gewinnung von Atemkondensat erfolgt meist in einer Kondensationsapparatur, in der die Atemluft durch Eiswasser auf 0 °C oder durch eine Kühlvorrichtung auf -20 °C gekühlt wird [66]. Nach 10 bis 15 min normaler Atmung können so 1 bis 3 ml EBC gewonnen werden [61, 66]. Die Menge an kondensiertem Wasser hängt dabei von der Atemgeschwindigkeit ab [61]. Weiterhin wird nur ein Teil des ausgeatmeten Wasserdampfs kondensiert, so dass das EBC-Volumen auch von der verwendeten Gewinnungsmethode abhängt. Für den kommerziellen EBC-Sammler ECoScreen (ViaSys, Höchberg) haben McCafferty *et al.* eine Effektivität von 30 – 40 % festgestellt [61].

Bei der Untersuchung der im Atemkondensat gefundenen Substanzen wurde besonders auf Marker für oxidativen Stress und/oder Entzündungen geachtet. Die meisten medizinischen Studien beschäftigen sich mit Veränderungen in der Menge dieser Marker bei Lungenerkrankungen, wie COPD (chronisch-obstruktive Lungenerkrankung, engl. chronic obstructive pulmonary disease), Asthma, Bronchiektase, oder z.B. nach Lungenschädigungen durch Rauchen. Zu diesen Markern gehören  $H_2O_2$ , NO und verwandte Stoffe (Nitrit, Nitrotyrosin, u.a.), Eicosanoide (Prostaglandine, Leukotriene, u.a.), Amine (Acetylcholin, Serotonin, Histamine), Ammoniak, Cytokine und andere Proteine (Interleukine, Interferon- $\gamma$ , u.a.), sowie der pH-Wert und andere Elektrolyte [66, 70].

### 3.2.3.1. Wasserstoffperoxid im Atemkondensat

Die Aktivierung von inflammatorischen Zellen, wie neutrophile und eosinophile Granulozyten und Makrophagen, führt zu einem Anstieg in der  $O_2^{\bullet-}$ -Produktion. Auch Epithelzellen können  $H_2O_2$  ausscheiden. Wie bereits im Abschnitt 3.2.2 beschrieben, hat  $O_2^{\bullet-}$  nur eine Lebensdauer von einigen Millisekunden bis wenige Sekunden [71] und wird schnell in andere ROS umgewandelt. Da  $H_2O_2$  sehr viel weniger reaktiv ist, kann dieses Molekül durch biologische Membranen und auch in die Atemwege gelangen [66]. Erhöhte  $H_2O_2$ -Werte im Vergleich zu gesunden Probanden wurden z.B. bei Rauchern [72] und bei Patienten mit Asthma [73-75], COPD [76, 77], Bronchiektasen [78, 79] oder zystischer Fibrose [80, 81] gefunden.

Die ausgeatmete  $H_2O_2$ -Konzentration beim mittelschweren Asthma korreliert mit den Eosinophilen im induzierten Sputum und ist bei Patienten mit schwerem, instabilem Asthma erhöht [75]. Dies mag damit zusammenhängen, dass Neutrophile, welche bei schwerem Asthma vorherrschen [82], mehr Superoxid-Radikale und damit mehr  $H_2O_2$  produzieren [74]. Rauchen führt dazu, dass Neutrophile und andere inflammatorische Zellen in die unteren Atemwege einwandern. Bei Rauchern wurden fünf mal so hohe  $H_2O_2$ -Konzentrationen im EBC gemessen wie bei Nichtrauchern [72]. Auch bei COPD-Patienten ist die ausgeatmete  $H_2O_2$ -Menge während einer Exazerbation höher als bei stabiler Erkrankung [76]. Zwar ist Rauchen die häufigste Ursache für COPD, doch nur 10 – 20 % der Raucher erkranken daran. Auch konnte kein Unterschied in der  $H_2O_2$ -Ausatmung zwischen Rauchern mit COPD und COPD-Patienten, die nie geraucht haben, festgestellt werden. Weiterhin besteht kein Zusammenhang zwischen der  $H_2O_2$ -Konzentration im Atemkondensat und dem täglichen Zigaretten-Konsum [66].

Bei Patienten mit Lungenkrebs wurde nach einer Lungenresektion ebenfalls eine erhöhte  $H_2O_2$ -Ausatmung festgestellt [83]. Bei Kindern mit infektiöser Exazerbation von zystischer Fibrose konnte die  $H_2O_2$ -Konzentration im EBC durch eine Behandlung mit Antibiotika signifikant verringert werden [81].

### 3.2.4. Chemotherapie und Neutrophile Granulozyten

Die meisten Chemotherapeutika, die zur Behandlung von Krebs verabreicht werden, wirken, in dem sie den Zellzyklus oder die DNA-Synthese und -Funktion auf unterschiedliche Weise beeinträchtigen. Da sich Krebszellen im Allgemeinen durch ein abnormes Zellwachstum und eine vermehrte Zellteilung auszeichnen, werden diese unerwünschten Zellen am schnellsten abgetötet. Aber auch andere schnell wachsende und sich teilende Zellen im Körper werden durch diese Medikamente geschädigt.



Die Bestimmung der Dosis ist also ein schwieriges Verfahren. Um alle Tumorzellen abzutöten, muss die Dosis des Chemotherapeutikums hoch genug sein. Allerdings werden durch eine zu hohe Medikamentengabe zu viele gesunde Zellen mit abgetötet, was im Extremfall letal sein kann.

Die meisten chemotherapeutisch wirkenden Medikamente können in folgende Gruppen eingeteilt werden: alkylierende Substanzen, Antimetabolite, Anthracycline, pflanzliche Alkaloide, Topoisomerase-Inhibitoren, monoklonale Antikörper und andere Anti-Tumor-Substanzen [84].

Alkylierende Substanzen, Antimetabolite und Anthracycline führen zu Schäden bei der DNA-Replikation in der S-Phase. Alkylierende Substanzen verändern die DNA dabei direkt, indem sie Alkylgruppen auf DNA übertragen. Antimetabolite sind in ihrer Struktur den Purinen und Pyrimidinen der Nucleinsäuren ähnlich und werden an Stelle der eigentlichen Basen eingebaut. Anthracycline sind Interkalatoren und führen zu Insertions- bzw. Deletionsmutationen [85].

Pflanzliche Alkaloide beeinträchtigen die Funktion der Mikrotubuli. Colchicin (aus *Colchicum autumnale*), Vinblastine (aus *Vinca*-Arten), Podophyllotoxin (aus *Podophyllum peltatum*), u.a. binden an Tubuline oder Tubulin-Dimere und verhindern eine weitere Polymerisation. Taxol (aus *Taxus*-Arten, v.a. südamerikanische *Taxus brevifolia*) stabilisiert Mikrotubuli. Dadurch wird der Aufbau der Mitose-Spindel gestört und die Zelle kann sich nicht mehr richtig teilen [85].

Topoisomerase-Inhibitoren stören die Umwandlung der DNA von einem Topoisomer in ein anderes und damit sowohl die Transkription als auch die Replikation.

Bei einigen Tumorzellen treten neue Antigene (Tumorantigene) in der Plasmamembran und im Zellinneren auf. Monoklonale Antikörper gegen diese Tumorantigene können das Immunsystem auf die abnormen Zellen aufmerksam machen. Die markierten Zellen werden besser von NK-Zellen erkannt und abgetötet.

Bis auf die monoklonalen Antikörper haben alle hier beschriebenen Chemotherapeutika eine allgemeine Wirkung. Sie unterscheiden nicht zwischen malignen und gesunden Zellen. Da die beeinträchtigten Zellmechanismen aber vor allem während der Zellteilung oder deren Vorbereitung aktiv sind, sind vor allem die sich schnell teilenden Tumorzellen betroffen. Aber auch gesunde Zellen, wie die Epithel-Stammzellen der Schleimhäute und die blutbildenden Zellen im Knochenmark, durchlaufen den Zellzyklus relativ schnell und werden durch die Medikamente geschädigt. Bei den Blutzellen sind vor allem die neutrophilen Granulozyten betroffen, die nur eine sehr kurze Lebensdauer haben (Halbwertszeit im Blut 6 – 7 h, Überlebenszeit im Gewebe 4 – 5 d) [86]. Die Neutrophilen sind normalerweise mit 55 – 68 % aller Leukozyten die häufigsten kernhaltigen Zellen im Blut [85]. Sie gehören zur

unspezifischen zellulären Immunabwehr und endocytieren in den Körper eingedrungene Mikroorganismen.

Bei der Endocytose wird, wie auch bei anderen Phagocyten, die NADPH-Oxidase aktiviert, welche Superoxid-Radikale produziert und in die Endosomen abgibt. Dort greifen die  $O_2^{\cdot-}$ -Radikale die aufgenommenen Zellen an und töten sie ab.

Der NADPH-Oxidase-Komplex besteht aus einer katalytischen Untereinheit, gp91<sup>phox</sup> (91 kDa großes Glycoprotein, *phox*: phagocyte oxidase), welche zusammen mit einer p22<sup>phox</sup> Untereinheit ein membrangebundenes heterodimeres Flavocytochrom *b*<sub>558</sub> bildet. Einige cytosolische regulatorische Untereinheiten werden für die Aktivierung des Enzyms benötigt, p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> und die kleine GTPase Rac2 [59, 60].

Bei einer Chemotherapie zur Krebsbekämpfung oder zur Verhinderung einer Manifestation von Metastasen werden die cytotoxischen Medikamente zunehmend in höheren Dosen und kürzeren Zeitabständen verabreicht. Dadurch werden zwar die malignen Zellen schneller und effektiver abgetötet, aber die Gefahr einer zu starken Schädigung von gesunden Zellen steigt an. Eine Verminderung der neutrophilen Granulozyten hat einen geringeren Schutz vor einfachen Infektionen zur Folge. Daher wird die Anzahl der Neutrophilen bzw. der Gesamtleukozytenzahl während einer Chemotherapie genau überwacht, was eine regelmäßige Blutabnahme und spezielle Analyseautomaten erfordert. Bei zu niedrigen Werten wird durch Gabe von Wachstumsfaktoren (Granulocyte-Colony Stimulating Factor, G-CSF, bzw. Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor, GM-CSF) die Produktion von Granulozyten im Knochenmark angeregt.

### 3.2.5. Energie-Stoffwechsel im Skelettmuskel

Muskelkontraktion beruht auf dem Zusammenspiel von Actin- und Myosinfilamenten. Dabei ziehen die Myosinfilamente mit Hilfe ihrer Myosinköpfe schritt für schritt die Actinfilamente zusammen. Pro Schritt eines Myosinkopfs wird dabei ein ATP-Molekül verbraucht. Das ATP wird im Muskel durch den aeroben Stoffwechselweg von Glycolyse, Citrat-Zyklus und Atmungskette bereitgestellt. Durch das Sauerstoff-Speicherprotein Myoglobin wird im Skelettmuskel dafür gesorgt, dass genügend Sauerstoff vor Ort vorhanden ist.

Bei einer ungewöhnlich hohen Belastung reicht der Sauerstoff aber für eine genügend schnelle Oxidation der Reduktionsäquivalente NADH durch die Atmungskette nicht aus. Ein anderer Weg zur Regenerierung von  $NAD^+$  für die Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat ist also nötig, damit weiter ATP zumindest durch die Glycolyse bereitgestellt werden kann. Der anaerobe Weg zur  $NAD^+$ -Regeneration im Skelettmuskel ist die Milchsäuregärung (Gleichung 8). Dabei wird das Pyruvat aus der Glycolyse durch die Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat reduziert. Das Laktat wird zum Teil in den

Blutkreislauf abgegeben. Durch die niedrige  $\text{NAD}^+$ -Konzentration wird gleichzeitig der aerobe Weg, d.h. der Citrat-Zyklus, gehemmt.



Ist die Belastungsphase vorbei und steht wieder genug Sauerstoff zur Verfügung, wird in einer Erholungsphase die so genannte „Sauerstoffschuld“ beglichen. Dies kann von einigen Minuten bis zu Stunden dauern. In dieser Zeit wird das im Muskel verbliebene Laktat durch die LDH wieder zurück zum Pyruvat oxidiert. Das Pyruvat wird dann in den Citrat-Zyklus eingespeist und der ATP-Vorrat wird auf dem effektiveren aeroben Weg aufgefüllt. Der Rest des Laktats wird in der Leber über die Gluconeogenese wieder zu Glucose aufgebaut wodurch der während der anaeroben Phase stark verminderte Glucose-Vorrat wieder etwas aufgefüllt wird. Bei der Gluconeogenese wird dabei aerob gewonnenes ATP verbraucht.

Die Belastungsintensität bei der das benötigte ATP gerade noch über den aeroben Weg bereitgestellt werden kann, wird in der Sportmedizin als „anaerobe Schwelle“ (engl. anaerobic threshold) bezeichnet. Bei dieser Belastung herrscht ein Gleichgewicht zwischen dem Sauerstoffverbrauch und der Sauerstoffaufnahme.

Die anaerobe Schwelle wird oft als eine Messgröße für den Trainingszustand einer Person betrachtet. Bei gut trainierten Athleten liegt die anaerobe Schwelle höher als bei untrainierten Personen. Durch regelmäßiges Training wird neben der Muskelmasse auch die Myoglobin-Menge im Muskel erhöht, wodurch mehr Sauerstoff während einer Belastungsphase zur Verfügung gestellt werden kann.

### 3.3. Teil B: Elektrodenmaterial

#### 3.3.1. HRP-Elektroden und Elektronentransfer

Das Verständnis von Redoxreaktionen und den damit verbundenen Elektronentransfer (ET)-Prozessen wurde in den 1950er und 60er Jahren von Rudolph A. Marcus wesentlich erweitert [87-89]. Laut der nach ihm benannten Marcus Theorie hängt die Geschwindigkeit des Elektronentransfers zwischen zwei Redoxspezies von intrinsischen und thermodynamischen Faktoren, sowie vom Abstand und der Orientierung des Elektronendonors zum Elektronenakzeptor ab [87]. Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{ET}$  wird durch Gleichung 9 beschrieben.

$$k_{ET} = \frac{2\pi}{\hbar} V_R^2 (FC) \quad (9)$$

$$V_R^2 = V_o^2 e^{-\beta(d-d_0)} \quad (10)$$

$$(FC) = \frac{e^{\left[ \frac{-(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4\lambda k_B T} \right]}}{(4\pi\lambda k_B T)^{1/2}} \quad (11)$$

Dabei ist  $\hbar$  die Plancksche Konstante ( $1,055 \times 10^{-34}$  Js),  $V_R$  bezeichnet die elektronische Kopplung der elektronischen Zustände des Donors und des Akzeptors mit denen nach dem Elektronentransfer und ist abhängig vom Abstand des Donors zum Akzeptor (Gleichung 10) und der Franck-Condon-Faktor (FC) wird durch Gleichung 11 näher erläutert [90].  $V_o^2$  steht für die maximale elektronische Kopplung,  $\beta$  ist der Exponentialkoeffizient der elektronischen Kopplung [90],  $d$  der kürzeste Abstand zwischen den Zentren von je einem Kohlenstoffatom (bei Aromaten) von Donor und Akzeptor und  $d_0$  eine Distanz für die Ausdehnung der  $\pi$ -Elektronenorbitale über die Kohlenstoffkerne hinaus (etwa 0,3 nm) [87].  $\Delta G^0$  ist die Gibbs-Standardreaktionsenergie (thermodynamischer Faktor),  $\lambda$  die Reorganisationsenergie (Energie für die Reorganisation der Umgebung des Redoxzentrums: Solvatationshülle, Proteinmatrix, etc.; intrinsischer Faktor),  $k_B$  die Boltzman-Konstante und T die Temperatur.

Bei ET-Prozessen zwischen kleinen, gelösten Molekülen befinden sich Elektronendonator und -akzeptor meist in unmittelbarer Nähe und der Abstand zwischen beiden ist so klein wie möglich. In diesem Fall wird die Geschwindigkeitskonstante vor allem von  $\Delta G^0$  und  $\lambda$  beeinflusst.

In biologischen Systemen sind meist Redoxproteine an ET-Prozessen beteiligt, bei denen die redoxaktive prosthetische Gruppe innerhalb der Proteinmatrix liegt. Der Abstand zwischen Donor und Akzeptor wird hier von der Proteinmatrix bestimmt und ist damit ein entscheidender Faktor (Gleichung 9 - 11) [87]. Da der Abstand zwischen der prosthetischen Gruppe und der Proteinoberfläche nicht in alle Richtungen gleich ist, ist die Orientierung von

Donor und Akzeptor zueinander wichtig. Bei einem natürlichen Donor-Akzeptor-Paar wird die richtige Orientierung durch elektrostatische Wechselwirkungen der Proteinmatrix stabilisiert. Die Marcus-Theorie lässt sich auch auf heterogene ET-Prozesse zwischen einer Elektrode und einem Redoxmolekül anwenden. Kleine Redoxmoleküle (Mediatoren) gelangen dicht an die Elektrode, so dass hier vor allem die intrinsischen und thermodynamischen Faktoren die Geschwindigkeit bestimmen. Bei Redoxproteinen sind, ähnlich wie bei ET-Prozessen in Lösung, der Abstand und die Orientierung des Proteins zur Elektrode entscheidend.

Bei amperometrischen HRP-Elektroden wird die HRP wie auch in Lösung durch Peroxid zu HRP-I oxidiert. Die Elektronen für die Rückreduktion von HRP-I zum Grundzustand werden von der Elektrode zur Verfügung gestellt (Gleichung 12) [25, 33]. Durch diesen Elektronenfluss entsteht ein Strom, welcher im Idealfall der Peroxid-Konzentration proportional ist.



Die Elektronen können dabei von Mediatoren von der Elektrode zum Enzym transportiert werden. Geeignete Mediatoren sind kleine, redoxaktive Moleküle, die leicht Elektronen an HRP-I und HRP-II abgeben aber auch leicht welche an der Elektrode wieder aufnehmen. Beispiele sind Hexacyanoferrat, Ascorbinsäure, Phenole und aromatische Amine [91]. Je nach Mediator werden die Elektronen einzeln oder gleichzeitig übertragen.

Mediatoren, die jedes Elektron einzeln übertragen, sind z.B. Ferrocen und Ferrocen-Derivate [45, 92-94], Hexacyanoferrat [33] und Osmium-Bispyridin-Komplexe [22, 47, 95-97]. Phenylendiamin [33], Hydrochinon [33], Catechol [33], 3-Hydroxytyramin (Dopamin) [33], Methylenblau und -grün [33] oder Tetrathiafulvalen (TTF) [98] übertragen zwei Elektronen auf einmal.

Wenn Mediatoren, wie Hexacyanoferrat, Hydrochinon oder Catechol der Analyt-Lösung zugegeben werden müssen (Enzym-Elektroden der zweiten Generation), bedeutet das bei der Untersuchung von Realproben einen zusätzlichen und damit unerwünschten Vorbereitungsschritt. Tetrathiafulvalen ist in wässrigen Lösungen weitgehend unlöslich und kann deshalb in bei Kohlepaste-Elektroden mit dem Enzym zusammen immobilisiert werden (siehe Abschnitt 3.3.2) [98]. Ferrocen-Derivate und Osmium-Bispyridin-Komplexe lassen sich gut in Polymere einbauen und mit der HRP co-immobilisieren. Bei diesen „mediator-modifizierten“ Elektroden bleibt der Mediator auf dem Sensor und der Vorbereitungsschritt entfällt („reagenzfreie“ Biosensoren der zweiten Generation).

Um einen Elektronendonator zu umgehen, wurden Elektrodenmaterialien untersucht, die in der Lage sind, das Enzym direkt in einem heterogenen ET-Prozess zu reduzieren (Enzym-Elektroden der dritten Generation). In diesem Fall werden die Elektronen von der Elektrode mit einer durch die heterogene Elektronentransfer-Geschwindigkeitskonstante,  $k_s$ , charakterisierten Geschwindigkeit bereitgestellt (Gleichung 12) [33, 35].

Solche direkten ETs (DETs) wurden während der letzten 15 Jahre untersucht [19]. Zumeist wurden Kohlenstoff oder Edelmetalle als Elektrodenmaterial verwendet [19, 28, 33]. Wie bereits erwähnt ist für einen schnellen ET eine kurze Distanz zwischen Elektrodenoberfläche und aktivem Zentrum, sowie die richtige Orientierung des Enzyms notwendig.

In den meisten Fällen wurde HRP einfach an der Elektrodenoberfläche adsorbiert. Während dadurch zwar eine kurze Distanz zwischen Elektrodenoberfläche und Enzym gewährleistet wird, ist die Orientierung des Enzyms, und damit der Abstand zwischen Elektrodenoberfläche und aktivem Zentrum, nur schwer kontrollierbar. Gorton *et al.* zeigten, dass nach einer zufälligen Adsorption von HRP auf spektroskopischen Graphitelektroden (SG-Elektroden) etwa 40 – 50 % des aktiven Enzym im DET effektiv sind [35]. Die heterogene ET-Geschwindigkeitskonstante  $k_S$  beträgt dabei  $1,9 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$  [35]. Schuhmann *et al.* versuchten dieses Verhältnis zu verbessern, indem sie HRP direkt auf der Elektrodenoberfläche rekonstituierten, und so für eine korrekte Orientierung des Enzyms sorgten [28]. Dazu wurde mit einem 12-C-Spacer Häm in auf der Elektrode immobilisiert und es konnte aktive HRP rekonstituiert werden. Der durch den langen Spacer verursachte Abstand zwischen Elektrodenoberfläche und HRP führte allerdings zu einer verminderten ET-Geschwindigkeit. Bei kürzeren Spacern konnte aufgrund der räumlichen Hinderung keine erfolgreiche Rekonstitution der HRP beobachtet werden [28].

Die Verwendung von rekombinantem Enzym war erfolgreicher in Hinblick auf die ET Effizienz [99-101]. Durch die Glykolysierung ist der Abstand zwischen dem Häm und der Enzymoberfläche bei der nativen HRP etwas größer als bei der HRP ohne posttranslationale Modifikation. Beim rekombinanten Enzym fehlen die Kohlenhydratketten, wodurch der Elektronentransfer erleichtert wird. Bei einer Adsorption von rekombinanter Wildtyp-HRP auf SG-Elektroden sind bei einem  $k_S$ -Wert von  $7,6 \pm 2,5 \text{ s}^{-1}$  etwa 60 % des Enzyms im DET effektiv [99]. Wird Asparagin 70 durch Valin (*Asn70Val*) oder Aspartat (*Asn70Asp*) ausgetauscht, steigert sich dieser Anteil auf 100 %, der  $k_S$ -Wert ist aber mit  $2,2 - 2,4 \text{ s}^{-1}$  kleiner als beim rekombinanten Wildtyp [99]. Durch einen C-terminalen Strep- oder His-Tag und Cysteine an unterschiedlichen Stellen konnte der am DET beteiligte Anteil des Enzyms auf 60 – 85 % erhöht werden (polykristalline Goldelektrode) [101]. Der  $k_S$ -Wert konnte durch diese Modifikationen auf über  $400 \text{ s}^{-1}$  gesteigert werden ( $C_{\text{HisrHRP}}$ , pH 6,0:  $k_S = 426,4 \pm 53,7 \text{ s}^{-1}$ ;  $C_{\text{StrepHRP309Cys}}$ , pH 6,0:  $k_S = 451,6 \pm 33,4 \text{ s}^{-1}$ ) [101].

Ein anderer Ansatz war, Peroxidasen aus anderen Quellen zu verwenden, die sich im isoelektrischen Punkt, in der Glykolysierung und/oder in der Struktur von der HRP unterscheiden. Die Peroxidase aus Süßkartoffeln hat einen  $k_S$ -Wert von  $4,8 \pm 2,3 \text{ s}^{-1}$ , wobei  $91 \pm 6 \%$  des Enzyms im DET effektiv sind. Für die Peroxidase aus Erdnuss liegt der  $k_S$  bei  $1,3 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$  (Anteil im DET  $44 \pm 7 \%$ ) und die Peroxidase aus Tabak bei  $2,6 \pm 1,0 \text{ s}^{-1}$  (Anteil im DET  $68 \pm 10 \%$ ) [102].

Als Elektrodenmaterial für die Untersuchungen zum DET wurden Kohlenstoff [99, 102-104], Gold [101, 103] und Platin [105, 106] verwendet, wobei die besten Ergebnisse mit Kohlenstoffelektroden erzielt wurden. Bei Kohlenstoffelektroden mit sauerstoffreichen Oberflächengruppen ( $-C=O$ ,  $-C-OH$ ,  $-COOH$ ; Abbildung 8) scheinen dabei besonders geeignet zu sein. Zu solchen Materialien zählen elektrochemisch voroxidiertes und hitzebehandeltes Graphit, aktivierter Kohlenstoff und edge-orientiertes pyrolytisches Graphit [33]. Es wird vermutet, dass C–O Gruppen, also Phenol- und Chinon-Gruppen, den Elektronentransfer erleichtern, möglicherweise in dem sie als Mediator dienen [33, 107].

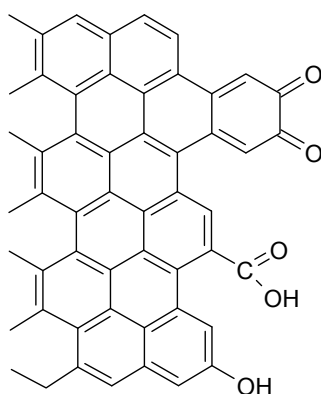


Abbildung 8 Teil einer möglichen Struktur von Graphit mit O-reichen Oberflächengruppen (nach [107]).

### 3.3.2. HRP-Elektroden aus Kohlepasten

Bulk-Komposit-Materialien, wie Kohlepasten, bieten den Vorteil, dass Stabilisatoren und Mediatoren einfach mit verarbeitet werden können. Weiterhin stören Enzymmodifikationen den Immobilisierungsprozess nicht [33, 98, 108, 109]. Zur Herstellung von HRP-Kohlepaste-Elektroden wird ein Kohlenstoffmaterial, z.B. Graphitpulver, mit HRP, Paraffin- oder Silikonöl und optional einem Mediator, z.B. Tetrathiafulvalen (TTF), vermischt und in Kapillaren gefüllt. Es wurde gezeigt, dass diese Elektroden  $H_2O_2$  in unteren nanomolaren Konzentrationen detektieren können [98].

Bei der Herstellung von Kohlepaste-Elektroden ist allerdings neben der Natur der einzelnen Komponenten auch das genaue Mischungsverhältnis, die Reihenfolge in der die Komponenten zusammengegeben und die Art und Weise in der sie vermischt werden entscheidend für die Charakteristika der entstehenden Elektroden [33]. Gorton *et al.* fanden, dass bei mediatorlosen Kohlepaste-Elektroden die Empfindlichkeit durch sorgfältige Auswahl des Graphitpulvers und durch Zusatzstoffe, wie Lactitol, um das 10 bis 17-fache gesteigert werden kann [110]. Als Grund für diese Empfindlichkeitssteigerung nannten sie vor allem die stabilisierende Wirkung von Lactitol auf das Enzym [110].

### 3.3.3. Modifizierter Graphit aus CoTMPP

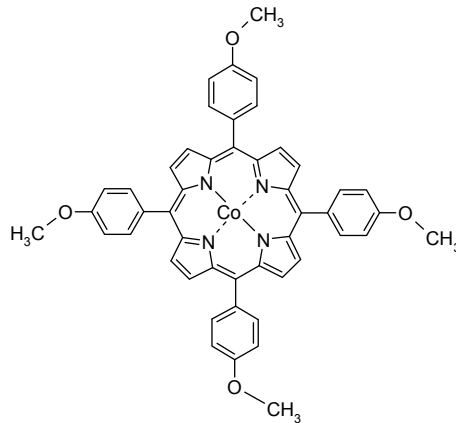


Abbildung 9 Struktur des Tetramethoxyphenylporphyrin-Kobalt-Komplexes.

Pyrolysierte Metall-Tetramethoxyphenylporphyrine (MeTMPPs, Me = Übergangsmetall) sind bekannt als Katalysatoren für die elektrochemische Sauerstoffreduktion [111]. Allerdings ist die Katalysator-Aktivität zu gering für eine technische Anwendung z.B. in Brennstoffzellen [112]. Bei pyrolysiertem Kobalt-Tetramethoxyphenylporphyrin (CoTMPP, Abbildung 9) wurde gezeigt, dass Versintereffekte während der Pyrolyse zu geringen spezifischen Oberflächen führen [112, 113].

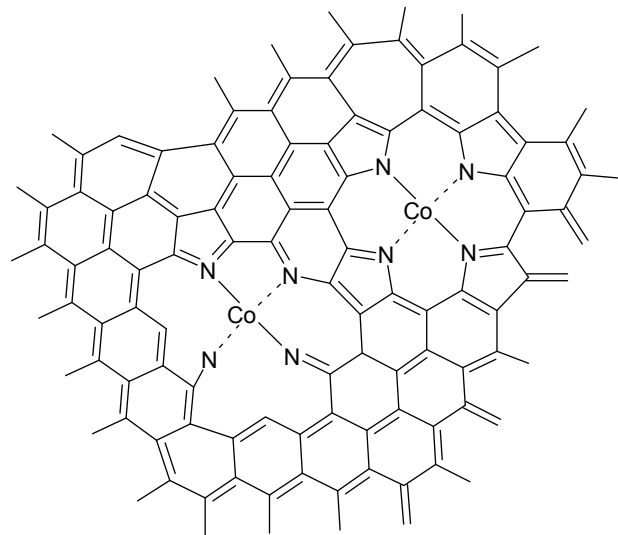


Abbildung 10 Teil einer möglichen Struktur von Graphit mit  $\text{CoN}_4$ -Zentren.

Bei der Pyrolyse von CoTMPP entsteht eine leitfähige Kohlenstoffmatrix in die aktive Zentren eingebettet sind [112-115]. Vermutlich bleibt die  $\text{CoN}_4$ -Chelat-Struktur des Porphyrins zumindest teilweise erhalten und bildet die aktiven Zentren des Endmaterials (Abbildung 10).



Gamburzev *et al.* verwendeten pyrolysiertes CoTMPP als Grundmaterial für die Herstellung von Glucose-Biosensoren aus Paste-Elektroden mit Glucoseoxidase als biologische Komponente [116-119].

Kürzlich wurde gezeigt, dass die Gegenwart von Metalloxalaten und Schwefel während der Pyrolyse von CoTMPP zu einem signifikanten Anstieg der Oberfläche des Endmaterials auf bis zu 1000 m<sup>2</sup>/g führt [112]. Die gasförmigen Zersetzungsprodukte des Oxalats „schäumen“ dabei die geschmolzenen Intermediate während der Pyrolyse auf. Zusätzlich fungieren die festen Reaktionsprodukte des Metalloxalats (vor allem Metall und Metalloxide) als Nano-Grundgerüst, auf das die karbonisierten Reaktionsprodukte des CoTMPP aufwachsen können. Nach der Pyrolyse kann dieses Grundgerüst durch nachfolgende Säurebehandlung aufgelöst werden und ein hochporöses Kohlenstoffmaterial bleibt übrig. Dieses Material zeigt eine sehr gute katalytische Aktivität gegenüber der Elektroreduktion von Sauerstoff [112].

### 3.4. Teil C: Enzym

#### 3.4.1. Metall-substituierte Häm-Proteine

Häm-Proteine enthalten Eisen-Porphyrin als prosthetische Gruppe. Porphyrine bestehen aus einem Tetrapyrrol-Ring an dem verschiedene Substituenden gebunden sein können. Der Tetrapyrrol-Ring besteht aus vier Pyrrol-Ringen, die über Methin-Gruppen miteinander verbunden sind. In der Mitte des  $\pi$ -Ringsystems können verschiedene Metallionen, meist Nebengruppen-Metallionen, komplexiert werden. In der Natur kommen neben den Eisen-Porphyrinen (Häm) auch andere Metallkomplexe mit Tetrapyrrol-Liganden vor. Am bekanntesten sind die Chlorophylle (Magnesium-Dihydro- und Tetrahydroporphyrine) und das Vitamin B<sub>12</sub> (Kobalt-Corrinoid) [120]. Der Faktor F430, die prosthetische Gruppe der Methyl-Coenzym-M-Reduktase und anderer Nickel-Enzyme, ist ein Nickel-Tetrahydrocorphin. Auch Zink-, Kupfer- und Mangan-Porphyrine kommen in lebenden Organismen vor. Vanadium-Porphyrine sind Bestandteile von Schiefer und Petroleum [120].

Zur Untersuchung des Funktionsmechanismus und der Rolle des Eisens in Häm-Proteinen wurde das Eisen durch andere Metalle, zumeist aus derselben Periode, ersetzt (z.B. Mn, Ni, Co etc.) (Tabelle 2). Das Eisen im Häm des Sauerstoffspeicherproteins Myoglobin wurde auch durch die schwereren Homologen Ruthenium und Osmium substituiert (Tabelle 2) [121-123].

Mangan(III)-Protoporphyrin IX rekonstituierte Häm-Proteine sind, wegen der chemischen Ähnlichkeit von Mangan und Eisen, die mit am meisten untersuchten metallsubstituierten Häm-Proteine [124-147]. Die Konformation der Proteine bleibt bei den mangansubstituierten Häm-Proteinen im Wesentlichen erhalten, obwohl sich ihre biologischen Eigenschaften unterscheiden. Mangansubstituiertes Cytochrom *b*<sub>5</sub> (MnCyt *b*<sub>5</sub>), Hämoglobin (MnHb) und Myoglobin (MnMb) zeigen keine Aktivität, während manganrekonstituierte Meerrettich Peroxidase (MnHRP) und Cytochrom *c* Peroxidase (MnCCP) zwar katalytisch aktiv sind, allerdings mit geringerer Aktivität [124, 130]. Weder Mn<sup>III</sup>Hb noch Mn<sup>III</sup>Mb oder die entsprechenden durch Dithionit reduzierten Verbindungen binden Sauerstoff oder Kohlenmonoxid [130]. Sowohl MnHRP als auch MnCCP bilden mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Peroxid-Verbindungen, welche durch Ferrocyanid oder Ascorbinsäure wieder reduziert werden können [130].

Bei der Reaktion von MnHRP mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entsteht eine Peroxid-Verbindung, MnHRP Compound I (MnHRP-I) [124, 130]. Im Gegensatz zur nativen HRP (FeHRP) wird diese Entstehung nicht durch reduzierende Substanzen beschleunigt. Die Peroxid-Verbindung der MnHRP wird nur langsam durch Substanzen wie Ferrocyanid, [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> und Ascorbinsäure reduziert [124, 130]. Weiterhin unterscheiden sich MnHRP Compound I

Protein	Metall	Literatur	Protein	Metall	Literatur
Meerrettich Peroxidase	Mangan	[124-132]	Hämoglobin	Kobalt	[148-153]
	Vanadium	[166]		Mangan	[144]
	Zink	[167]		Nickel	[154, 155]
Cytochrom c Peroxidase	Mangan	[130-132, 143]		Kupfer	[144]
Mikroperoxidase	Mangan	[147]	Prostaglandin H-2 Synthase 1	Mangan	[138-142, 156]
Myoglobin	Mangan	[130, 133-137]	Cytochrom c	Zink	[157-161]
	Kobalt	[133, 148, 149, 152, 153, 168-177]		Nickel	[162]
	Zink	[133, 155, 178-180]		Kobalt	[163, 164]
	Nickel	[133, 154, 155]		Zinn	[160]
	Vanadium	[166]	Cytochrom <i>b</i> <sub>5</sub>	Mangan	[145]
	Kupfer	[133]	lösliche Guanylylcyclase	Mangan	[146]
	Ytterbium	[181]		Kupfer	[146]
	Ruthenium	[121, 122]	Nitrit Reduktase	Zink	[165]
	Osmium	[123]			

Tabelle 2 Metall substituierte Häm-Proteine.

(MnHRP-I) und FeHRP Compound I (FeHRP-I) in der Art des Radikals [124, 127]. In der MnHRP-I befindet sich das Radikal in der Proteinmatrix, in der FeHRP-I aber im  $\pi$ -System des Porphyrinringes [124, 127].

Kobaltsubstituiertes Myoglobin (CoMb) und Hämoglobin (CoHb) binden reversibel Sauerstoff, wobei das kooperative Verhalten beim Hämoglobin erhalten bleibt [148]. Die Bindungsstärke des CoHb beträgt etwa ein Drittel des Wertes für die native Form. Eine Bindung von Kohlenmonoxid an CoHb kann nicht nachgewiesen werden [148]. Ruthenium(II)-substituiertes Myoglobin (Ru<sup>II</sup>Mb) bindet Kohlenmonoxid, wird aber von Sauerstoff zu Ru<sup>III</sup>Mb oxidiert [121].

Myoglobin konnte auch mit Carbonyl-Osmium(II)-Mesoporphyrin IX (Os<sup>II</sup>(MIX)(CO)) und mit Osmium(II)-Mesoporphyrin IX (als Os<sup>II</sup>(MIX)(DMF)<sub>2</sub>; DMF = Dimethylformamid) zu Os<sup>II</sup>(CO)Mb bzw. Os<sup>III</sup>Mb (nach aerober Oxidation) rekonstituiert werden [123]. Das Resonanzramanspektrum des Os<sup>II</sup>(CO)Mb ist im Bereich von 1200 bis 1600 cm<sup>-1</sup> ähnlich dem Os<sup>II</sup>(MIX)(CO)(py) (py = Pyridin), das UV-VIS-Spektrum praktisch identisch mit dem des Os<sup>II</sup>(MIX-DME)(CO)(Im) (DME = Dimethylester, Im = Imidazol) [123]. Das UV-VIS-Spektrum des Os<sup>III</sup>Mb ist ähnlich dem des Osmium(III)octaethylporphyrins. Das ruthenierte Derivat des OsMb, das Os<sup>III</sup>(Ru<sub>3</sub>Mb), katalysiert die vier-Elektronen-Reduktion von molekularem Sauerstoff durch Ascorbinsäure, Os<sup>III</sup>Mb selbst nicht [123]. Beim ruthenierten Derivat ist an drei Histidin-Resten des Proteingerüsts je ein Pentaamminruthenium(III) komplexiert [182].

Elektrochemisch wurden bisher nur wenige metallsubstituierte Häm-Proteine untersucht. Rusling *et al.* untersuchten 1998 in einem Didodecyldimethylammonium-Bromid (ddab)-Film auf einer PG-Elektrode immobilisiertes CoMb und bestimmten für das Co<sup>I</sup>Mb/Co<sup>II</sup>Mb ein Redoxpotential von -0,85 V (SCE) [173]. Taniguchi *et al.* bestimmten 1999 erstmals das Redoxpotential des MnMb [137]. Dazu untersuchten sie potentialabhängige Unterschiede im UV-VIS Spektrum an einer In<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Elektrode in Abwesenheit und in Gegenwart verschiedener Mediatoren, wobei der Elektronentransfer bei Verwendung von Oxazin-170 Perchlorat als Mediator am schnellsten war. Das Redoxpotential des MnMb (-0,32 V vs. Ag/AgCl) ist positiver als das des freien Mn<sup>III</sup>-Protoporphyrins (-0,46 V vs. Ag/AgCl in Abwesenheit und -0,48 V in Gegenwart von Imidazol) und negativer als das native Mb (-0,14 V vs. Ag/AgCl) [137]. Im gleichen Jahr bestimmten sie mit dieser Methode das Redoxpotential des Co<sup>II</sup>Mb/Co<sup>III</sup>Mb (-0,1 V vs. Ag/AgCl) mit Azure A als Mediator [171]. Lin *et al.* fanden wenig später bei der Untersuchung von MnMb im ddab-Film auf einer PG-Elektrode zwei Redox-Paare (-0,25 V und -0,41 V vs. SCE) [134]. Weitere Untersuchungen zeigten ein ähnlich ungewöhnliches Redox-Verhalten der MnCCP. Sowohl freies Mn-Porphyrin als auch FeMb und FeCCP zeigen unter entsprechenden Bedingungen nur jeweils ein Redox-Paar im CV.

### 3.4.2. Osmium-Porphyrin

Bei Os-Porphyrinen ist, verglichen mit Fe-, Mn- und Ru-Porphyrinen, die Metall-Ligand-Bindung von axialen Liganden sehr viel fester [183, 184]. Weiterhin kann Osmium als 5d-Metall höhere Oxidationsstufen annehmen. Es wurden Osmium-Porphyrin-Komplexe („Osmochrome“) in verschiedenen stabilen Redoxzuständen (Oxidationszahlen 2 bis 6) charakterisiert [183-188]. Da das Osmium ein schwereres Homologes des Eisens ist, wurden Osmochrome als Modelle für Häm-Proteine untersucht [120, 184, 189].

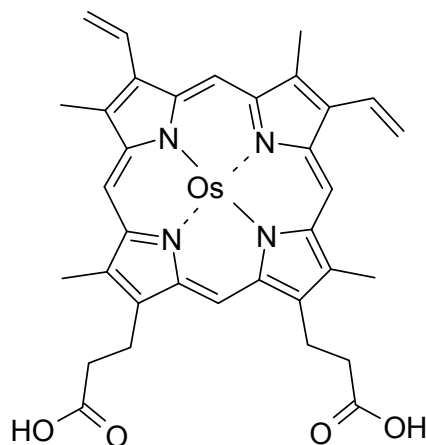


Abbildung 11 Struktur des Protoporphyrin IX-Osmium-Komplexes ohne axiale Liganden.

Die stärkere Metall-Ligand-Bindung macht Osmochrome zu geeigneten Modellen für Cytochrome, die kein Kohlenmonoxid binden (z.B. Cytochrom  $b_5$  oder Cytochrom  $c$ ) [120, 183, 184]. Die primäre Funktion dieser Proteine ist der Elektronentransfer. Dazu bindet das Proteingerüst die axialen Liganden fest an das Eisenzentrum. Freie Fe-Porphyrine verlieren leicht einen der beiden Stickstoff- oder Schwefel-Donor-Liganden und binden dafür molekularen Sauerstoff [183, 190]. Bis(1-Methylimidazol)-Osmium(II)-Octaethylporphyrin ( $\text{Os}^{\text{II}}(\text{OEP})(1\text{-Meim})_2$ ) hat, wie auch Cytochrom  $b_5$ , zwei Stickstoff-Donor-Liganden (Methylimidazol beim Os-Porphyrin, Histidin bei Cyt  $b_5$ ) als axiale Liganden [120, 183].

Die feste Osmium-Ligand-Bindung ermöglicht auch die Synthese von axial unsymmetrischen Bisligand-Osmium(II)-Porphyrinen. Wie beim Cytochrom  $c$  kann dabei ein Ligand ein Schwefel-Donor (Methionin 80 bei Cyt  $c$ , Thioether bei Os-Porphyrin) und der andere Ligand ein Stickstoff-Donor (Histidin 18 bei Cyt  $c$ , Imidazol bei Os-Porphyrin) sein. An freien Fe-Porphyrinen ist eine zentrale N—Fe—S-Einheit nur herstellbar, wenn mindestens einer der Donoren über eine Seitenkette kovalent mit dem Tetrapyrrol-Ring verbunden ist [184, 191].

Diese Osmochrome sind der prosthetischen Gruppe der Cytochrome nicht nur strukturell, sondern auch spektroskopisch und funktionell ähnlich [120]. Außer einer hypsochromischen Verschiebung sind die optischen Absorptionsspektren von Osmochromen und Hämochromen sehr ähnlich [120, 183]. Zwischen Osmochromen (reduzierte Form) und ihren

korrespondierenden Osmichrom-Kationen (oxidierte Form) besteht ein schneller Elektronentransfer und weder Kohlenmonoxid noch Sauerstoff binden bei Raumtemperatur in neutralen Medien [120].

Eine weitere funktionelle Gemeinsamkeit zwischen Osmochromen und Cytochromen ist der Unterschied im Redoxpotential zwischen dem symmetrischen Bis(imidazol)-System und dem unsymmetrischen Thioether/Imidazol-System. Die Differenz der Redoxpotentiale von Cytochrom  $b_5$  und Cytochrom  $c$  beträgt  $-0,235$  V [120], bei  $\text{Os(OEP)(1-Meim)}_2$  und  $\text{Os(OEP)(1-Meim)(THT)}$  (THT = Tetrahydrothiophen) beträgt die Differenz  $-0,18$  V [184] und bei den korrespondierenden 5,10,15,20-Tetrakis(*p*-Tolyl)porphyrinen  $-0,2$  V [120].

Bisdimethylformamid-Osmium(II)-Mesoporphyrin IX ( $\text{Os}^{\text{II}}(\text{MIX})(\text{DMF})_2$ ) katalysiert eine vier-Elektronen-Reduktion von Sauerstoff zu Wasser [123, 192]. Für die aerobe Oxidation von Ascorbinsäure hat dieses Porphyrin bei pH 5,5 einen  $K_m$ -Wert von  $2,6 \times 10^{-5}$  M und einen  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $0,013 \text{ s}^{-1}$ , wobei Ascorbinsäure und Sauerstoff im Verhältnis von 2:1 umgesetzt werden [123].

Einige Osmium(III)-Porphyrin-Komplexe katalysieren, ähnlich wie das Cytochrom P450, die Epoxidation und Hydroxylation von Cyclohexen und Styrol [193].

Für einen besseren Vergleich mit biologischen Systemen fanden Buchler *et al.* eine Methode zur Synthese von wasserlöslichen Osmium-Porphyrinen, in dem sie Osmium-Tetraphenylporphyrin ( $\text{Os}(\text{TPP})$ ) sulfonierten oder die Carbonsäureester des Osmium-Tetrakis-(4-carbomethoxyphenyl)porphyrins ( $\text{Os}(\text{TMeCPP})$ ) verseiften [189].

## **4. Materialien und Methoden**

#### **4.1. Teil A: Medizinische Studien**

Die klinische Pilotstudie „H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Laktat in der Ausatemluft als Parameter für eine nicht-invasive Verlaufskontrolle von Chemotherapie-Patientinnen“ wurde am interdisziplinären Brustzentrum (IBZ) der Universitätsklinik Charité in Berlin-Mitte durchgeführt.

Die Vorstudie zur Integration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und Laktat-Messung in der Ausatemluft in die Trainingsüberwachung wurde am Institut für Sportmedizin und Prävention an der Universität Potsdam durchgeführt.

##### **4.1.1. Atemkondensat-Sammlung**

Das Atemkondensat wurde mit einem ECoScreen-Gerät (ViaSys, Höchberg) gesammelt. Die Atemluft wurde über ein Nichtrückatemventil in das Gerät geleitet und auf -20 °C abgekühlt. An der Charité wurde eine Geräteversion verwendet, bei der das Kondensat aus einem Kondensierrohrchen in einen Auffangbehälter geleitet wurde. Die Standardisierung der Atemkondensatsammlung erfolgte hier über das Gesamatemvolumen (100 l), welches mit einem ECoVent-Gerät aufgenommen wurde. Gleichzeitig wurden weitere Atemparameter, wie Gesamtzeit, Atemzugvolumen, Atemfrequenz und andere, registriert. Die Patientinnen wurden angewiesen normal durch den Mund in ein am Gerät aufgestecktes Mundstück zu atmen. Das Volumen des Atemkondensats wurde durch auswiegen des Auffangbehälters mit und ohne Kondensat bestimmt.

In der Sportmedizin wurde eine andere Version des ECoScreen verwendet, in dem die Kondensierung in zwei Plastikbeuteln erfolgte. Die Standardisierung wurde hier über die Zeit vorgenommen. Den Probanden wurde eine Atemmaske aufgesetzt, von der über einen Schlauch die Ausatemluft in das Gerät geleitet wurde. Das Atemvolumen und einige andere Parameter wurden ebenfalls erfasst. Das Atemkondensatvolumen wurde durch aufziehen in einer Spritze bestimmt.

##### **4.1.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Atemluft**

Die Wasserstoffperoxid-Konzentration im Atemkondensat wurde mit dem Messgerät ECoCheck (FILT GmbH, Berlin) ermittelt. Dieses Gerät enthält einen amperometrischen HRP-Biosensor. Dabei wurde HRP zusammen mit einem Mediator in einer Polyurethanmatrix auf einer Platin-Dickschichtelektrode immobilisiert. Für jeden Messtag wurde ein neuer Sensor verwendet.

Die erhaltene Atemkondensat-Konzentration wurde mit dem Kondensatvolumen und dem Gesamatemvolumen auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration in der Atemluft umgerechnet.



#### **4.1.3. Laktat in der Atemluft**

Die Laktat-Konzentration im Atemkondensat wurde mit dem Messgerät LaktatProfi3000 (ABT GmbH, Berlin) ermittelt, wobei für die Messung in Atemkondensat angepasste Systemlösungen und Sensoren verwendet wurden. In den amperometrischen Sensoren ist Laktatoxidase (LOD) in einer Polyurethanmatrix auf einer Platin-Dickschichtelektrode immobilisiert. Die Sensoren waren im Messgerät für etwa zwei Wochen stabil.

Die erhaltene Atemkondensat-Konzentration wurde mit dem Kondensatvolumen und dem Gesamatemvolumen auf die Laktat-Konzentration in der Atemluft umgerechnet.

In der Sportmedizin wurde zusätzlich die Laktat-Konzentration mit einem ECoCheck-Gerät bestimmt, das mit einem LOD/HRP-Biosensor ausgestattet war.

#### **4.1.4. Laktat im Blut**

Die Laktat-Konzentration im Vollblut (Charité: venöses Vollblut, Sportmedizin: kapillares Vollblut) wurde mit dem Messgerät LaktatProfi3000 (ABT GmbH, Berlin), hier mit Standard-Systemlösung und -Sensoren, ermittelt. Die Sensoren für die Messung im Blut waren im Messgerät für etwa vier Wochen stabil.

In der Sportmedizin wurde zusätzlich die Laktat-Konzentration im hämolysierten Kapillarblut mit einem BIOSEN S\_line-Gerät (EKF-Diagnostic GmbH, Barleben) bestimmt.

#### **4.1.5. Messprotokoll Charité**

An dieser Studie nahmen 19 Patientinnen teil, die vom medizinischen Personal des Brustzentrums unter Leitung von Klaus-Jürgen Winzer und Heinz-Ulrich Aldinger ausgewählt wurden. Alle hatten ein operables, nicht metastasiertes Mammakarzinom, wodurch bis auf das mäßige Operationstrauma keine weiteren relevanten Einflussfaktoren bis auf die Chemotherapie zu verzeichnen waren. Die Chemotherapie verlief in dreiwöchentlichen Zyklen. Bei einer Patientin waren nur 4, bei drei Patientinnen 8 Zyklen vorgesehen. Alle weiteren Patientinnen unterliefen 6 Zyklen. Eine hiervon nahm nach drei Zyklen nicht weiter an der Studie teil.

Bei den Patientinnen wurde neben der wöchentlichen routinemäßigen Blutprobe für das Differentialblutbild wie oben beschrieben Atemkondensat gesammelt. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und Laktat-Konzentration im Atemkondensat, sowie der Laktatgehalt im Blut wurden direkt vor Ort bestimmt.

Ergab die Messung der neutrophilen Granulozyten, dass sich ein sehr niedriger Nadir abzeichnet, d.h. ein sehr niedriger Tiefstwert für die Anzahl der Neutrophilen, oder ließen die vorhergegangenen Zyklen dies vermuten, so wurde Filgrastim (Neupogen®), ein Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF), bzw. Pegfilgrastim (Neulasta®), ein Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) eingesetzt, so dass das

Überleben und die Proliferation unreifer Vorläufer-Zellen des hämatopoetischen Systems und determinierter Progenitorzellen für neutrophile Granulozyten stimuliert wurde. Die Entwicklungszeit von den Vorläuferzellen zu den reifen neutrophilen Granulozyten verkürzt sich so von ca. 7 auf 1,5 Tage. Als Richtwert für eine Behandlung gilt dabei eine Neutrophilen-Zahl von  $1 \text{ nl}^{-1}$ .

Die Blutabnahme und die medizinische Betreuung der Patientinnen erfolgten durch das Personal des Brustzentrums, die Erstellung des Differenzialblutbilds durch das klinische Analyselabor der Charité.

#### **4.1.6. Messprotokoll Sportmedizin**

Bei der sportmedizinischen Studie wurde ein Fahrradergometer-Test durchgeführt. Die Probanden führen das Fahrradergometer bei gleich bleibender Umdrehungszahl, wobei der Widerstand alle 5 min um 20 W erhöht wurde. Beginn war bei 80 W. Am Ende jeder Stufe sowie vor und nach der Ergometerfahrt wurde Kapillarblut aus dem Ohrläppchen entnommen und die Laktat-Konzentration im Vollblut sowie im Hämolysat bestimmt. Bei jeder zweiten Stufe sowie nach der Ergometerfahrt wurde zusätzlich Atemkondensat gesammelt und die  $\text{H}_2\text{O}_2$ - und Laktatkonzentration und der pH-Wert bestimmt.

An dieser Studie nahmen insgesamt 6 männliche Probanden im Alter von 23 bis 55 Jahren teil. Davon waren 3 Personen trainierte Sportler.

An den Messungen waren weiterhin beteiligt: Sarah Schwieger, Doris Seipelt und Frank Mayer vom Institut für Sportmedizin und Prävention (Sportmedizin & Sportorthopädie), Gunther Becher und Manfred Decker von der FILT GmbH und Ulla Wollenberger vom Institut für Biochemie und Biologie (Analytische Biochemie).

## 4.2. Teil B: Pyrolysiertes CoTMPP als Elektrodenmaterial

### 4.2.1. Präparation von Pyrolysierten MeTMPPs

Die Präparation und physikochemische Charakterisierung der pyrolysierten MeTMPPs wurde am Hahn-Meitner-Institut (Berlin) von Iris Herrmann durchgeführt.

#### 4.2.1.1. Auf einem Kohlenstoff-Träger pyrolysiertes MeTMPP

Die Präparation von CoTMPP auf Kohlenstoff als Trägermaterial (CoTMPP/BP) wurde wie in [113] beschrieben durchgeführt. 1,05 g BP (Black Pearls, hochporöser Kohlenstoffträger von Cabot, Hanau; ca. 1500 m<sup>2</sup>/g) wurden in 100 ml THF (Tetrahydrofuran; Riedel-de Haën, Seelze) aufgeschlämmt und eine Lösung von 0,26 g CoTMPP (Kobalt-Tetramethoxyphenylporphyrin; ACROS Organics, Schwerte) in 200 ml THF wurde zugegeben. Im Fall der FeTMPPCl/BP wurden 0,098 g BP in 100 ml THF suspendiert und mit 0,04 g FeTMPPCl (Eisen-Tetramethoxyphenylporphyrin-Chlorid; Porphyrin Systems, Lübeck) in 100 ml THF vermischt. Beide Suspensionen wurden anschließend für 40 min Ultraschall ausgesetzt. Danach wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt. Die erhaltenen Granulate wurden in einer Schlagmühle 5 s lang zerkleinert. Um restliches THF zu entfernen wurden die Materialien für 3 h Vakuum getrocknet.

Die Pyrolyse wurde wie in [112] beschrieben durchgeführt. Dazu wurden die Materialien in einem Spaltofen bis zu 450 °C unter Argon erhitzt (Argonfluss 110 ml/min, Heizgeschwindigkeit 300 °C/min). Die Verweildauer bei dieser Temperatur betrug bis zu zwei Stunden. Anschließend wurde die Temperatur auf 750 °C erhöht und für eine Stunde beibehalten. Das Material wurde dann in 30 min auf Raumtemperatur (RT) heruntergekühlt.

#### 4.2.1.2. Mit einem Aufschäumer bzw. Stukturbildner pyrolysiertes CoTMPP

Wie in [112] beschrieben, wurden  $8,2 \times 10^{-4}$  mol Metalloxalat (FeC<sub>2</sub>O<sub>4</sub> oder SnC<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), 0,019 mol CoTMPP und Schwefel (0 bis 8 Gew.-%) in einem Mörser gut vermischt. Die Mischungen wurden dann unter Argon in einem Spaltofen erhitzt. Die Hitzebehandlung erfolgte zunächst bei 450 °C für 2 h und anschließend bei 750 °C für 1 h unter kontinuierlichem Argonfluss. Hinterher wurden die Materialien auf RT abgekühlt bevor sie Luft ausgesetzt wurden. Schließlich wurden sie für 30 min in 1 M HCl-Lösung konditioniert, um katalytisch inaktive Nebenprodukte zu entfernen. Nach Filtration wurden die Proben mit destilliertem Wasser gespült und bei RT im Vakuum getrocknet.

#### 4.2.1.3. Weitere Oberflächenbehandlungen

Ein Material wurde unter Argon auf 750 °C erhitzt und mit CO<sub>2</sub> bzw. N<sub>2</sub> für 30 min behandelt. Ein anderes Material wurde mit 8 M HNO<sub>3</sub> bei 130 °C für 4 h behandelt und anschließend

unter vermindertem Druck bei 350 °C getrocknet. Weiterhin wurde ein Material unter Argon auf 750 °C erhitzt und für 10 min mit SO<sub>2</sub> behandelt.

#### 4.2.2. Elektrodenpräparation

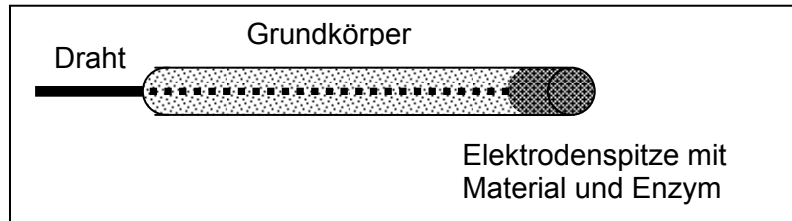


Abbildung 12 Schema der Paste-Elektrode mit Kontaktdraht, Elektroden Grundkörper und Elektrodenspitze mit dem eigentlichen Elektrodenmaterial und Enzym.

Für den Elektroden Grundkörper (Abbildung 12) wurde Graphitpulver (Fluka, Steinheim) gut mit Paraffinöl (Fluka, Steinheim) vermischt. Der Massenanteil des Paraffinöls lag dabei zwischen 33 % und 13 %. Kleine Paraffinöl-Mengen wurden als 15 mg/ml Lösung in Petrolether (destilliert, Riedel-de Haën, Seelze) zugegeben, das Lösungsmittel evaporierte beim Vermischen. Die Graphit/Paraffinöl-Mischung wurde in eine Glaskapillare (Mikro-Hämatokrit Kapillaren, Innendurchmesser 1,15 mm, Brand, Wertheim) gestopft und mit einem Nickel-Draht kontaktiert. An der Spitze der Kapillare wurde etwas Platz für das Elektrodenmaterial gelassen.

Das Elektrodenmaterial wurde ggf. mit PEI (Polyethylenimin; Sigma-Aldrich, Steinheim; 25:1 als 0,2 %ige Lösung), HRP (Meerrettich Peroxidase; Sigma-Aldrich, Steinheim; 5:1 als Lösung oder fest) und/oder TTF (Tetrathiafulvalen; Sigma-Aldrich, Steinheim; 200:3 bis 100:1 als Aceton-Lösung) vermischt. Eventuell verwendeter Puffer wurde in einer Vakuumzentrifuge entfernt.

Das Elektrodenmaterial wurde direkt oder nach der Vorbehandlung wie zuvor das Graphitpulver mit Paraffinöl vermischt und in die Spitze der Kapillare gefüllt.

Wurde Elektrodenmaterial ohne Vorbehandlung und wenig Paraffinöl verwendet, dann wurden die Elektroden anschließend über Nacht in einer 2 – 20 mg/ml HRP-Lösung (in Phosphat-Puffer mit 0,5 % Nafion, Sigma-Aldrich, Steinheim) bei 4 °C inkubiert, für 2 h bei Raumtemperatur getrocknet und bei 4 °C gelagert.

#### 4.2.3. Elektrochemische Messungen

##### 4.2.3.1. Amperometrische Messungen

Die Elektrode wurde in einer 1 ml Batch-Zelle platziert, die in der arbeitsgruppeninternen Werkstatt konstruiert und hergestellt wurde und mit einem Magnetrührer verbundenen war. Eine Platin-Wendel wurde als Gegenelektrode und eine Ag/AgCl/1 M KCl-Elektrode als

Referenz verwendet. Die Elektroden wurden mit einer CHI 750B electrochemical workstation (CH Instruments Inc., Austin, USA) verbunden. Soweit nicht anders bezeichnet wurde ein Potential von -0,05 V gegen Ag/AgCl angelegt und Phosphat-Puffer (100 mM Kalium-Phosphat, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 7,0) als Elektrolyt-Lösung verwendet.

#### *4.2.3.2. Rotierende Scheibenelektrode (Rotating Disk Electrode, RDE)*

Eine Kapillare, die in der arbeitsgruppeninternen Werkstatt konstruiert und hergestellt wurde und mit der Rotationsstange des Gerätes (RDE; EG&G Model 636, Princeton Applied Research, Princeton, USA) verbunden werden konnte, wurde verwendet. Die Elektrode wurde in HRP-Lösung (20 mg/ml, 0,5 % Nafion) für 1 – 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Etwas zusätzliches Paraffinöl (15 mg/ml in Petrolether) wurde auf die Elektrode gegeben und diese dann auf Schreibpapier poliert. Die so präparierte Elektrode wurde mit der Rotationsstange des RDE-Gerätes verbunden und in einer 90 ml Batch-Zelle platziert. Eine Ag/AgCl/1 M KCl Elektrode wurde als Referenz verwendet. Die Elektroden wurden an einen PED 300 pulsed electrochemical detector (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) angeschlossen und ein Potential von -0,05 V gegen Ag/AgCl wurde angelegt. Der Strom wurde mit einem DUO.18 (World Precision Instruments, Berlin) aufgezeichnet.

#### **4.2.4. Weitere Chemikalien**

Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 10,7 M, titriert gegen  $\text{KMnO}_4$  [194]) war von Merck (Darmstadt). Das Platin-Material auf Kohlenstoffbasis von der Firma E-TEK (Frankfurt am Main).

### 4.3. Teil C: Osmium-substituierte Meerrettich Peroxidase

#### 4.3.1. Os-Protoporphyrin IX Darstellung

##### 4.3.1.1. Einbau von Osmium(II) in Protoporphyrin IX-Dimethylester

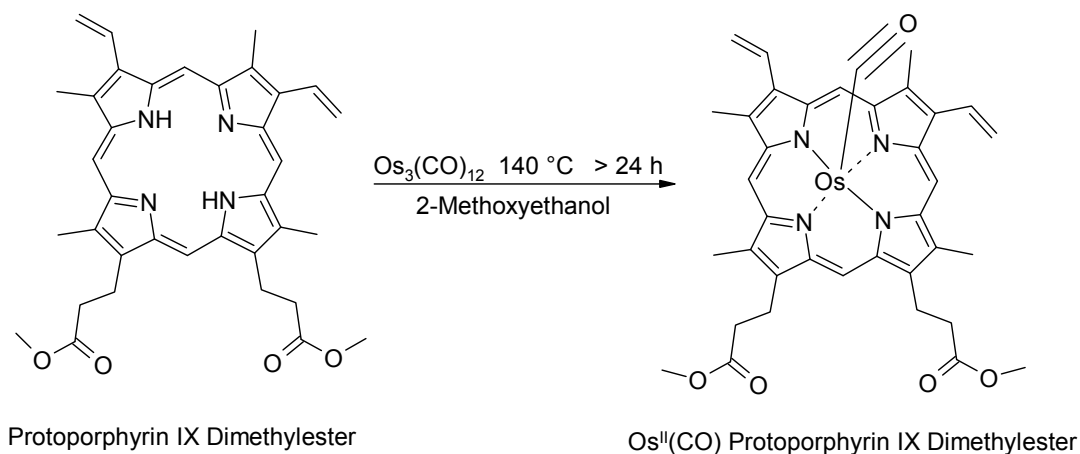


Abbildung 13 Reaktionsgleichung zum Einbau von Os<sup>II</sup> in PIX-DME.

Osmium wurde nach Che *et al.* in Protoporphyrin IX-Dimethylester (PIX-DME) eingebaut (Abbildung 13) [187]. Dazu wurden 102,8 mg Mesoporphyrin IX-Dimethylester (594,76 g/mol; 172,8  $\mu\text{mol}$ ; Sigma-Aldrich, Steinheim) und 157,5 mg Triosmiumdodecacarbonyl ( $\text{Os}_3(\text{CO})_{12}$ , 906,73 g/mol; 173,7  $\mu\text{mol}$ ; ABCR, Karlsruhe) über 24 h bei 140  $^\circ\text{C}$  in ca. 20 ml 2-Methoxyethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim) unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre refluxiert. Das blutrote Produkt wurde durch Zugabe von gesättigter NaCl-Lösung gefällt und abzentrifugiert.

Das Rohprodukt wurde an eine Kieselgel-Säule (Kieselgel 60, 0,063 – 0,200 mm, Merck, Darmstadt) chromatographiert. Mit Dichlormethan (DCM, Riedel-de Haën, Seelze) wurde eine gelbe Fraktion eluiert (restliches  $\text{Os}_3(\text{CO})_{12}$ ). Mit DCM/2 % Aceton wurden dann zunächst eine rotbraune Fraktion (restliches Ausgangs-Porphyrin) und anschließend eine blutrote Fraktion (größte Fraktion, ca. 40 mg, 808,94 g/mol, ca. 50  $\mu\text{mol}$ , Os-Porphyrin) eluiert.

##### 4.3.1.2. Oxidation zu Os<sup>VI</sup>(O)<sub>2</sub>-Protoporphyrin IX-Dimethylester

Der CO-Ligand wurde nach Buchler durch Oxidation entfernt (Abbildung 14) [189]. Dazu wurden etwa 40 mg Os<sup>II</sup>(CO)-Protoporphyrin IX Dimethylester in ca. 50 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$  (1:1) gelöst und mit 60  $\mu\text{l}$  70 % *tert*-Butylhydroperoxid ( $t\text{BuO}_2\text{H}$ ; Sigma-Aldrich, Steinheim) versetzt. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 ml 5 % Eisen(II)-sulfat ( $\text{FeSO}_4$ ; Merck, Darmstadt) gestoppt. Die organische Phase wurde anschließend 2  $\times$  mit Wasser gewaschen.

Das Rohprodukt wurde an einer Aluminiumoxid-Säule chromatographiert ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , Akt. III; Aluminiumoxid 90 neutral, 0,05 – 0,2 mm; Roth, Karlsruhe). Mit Dichlormethan wurde ca. 30 mg grünbraunes Produkt eluiert. Restliche Ausgangssubstanz wurde mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (10:1) eluiert.

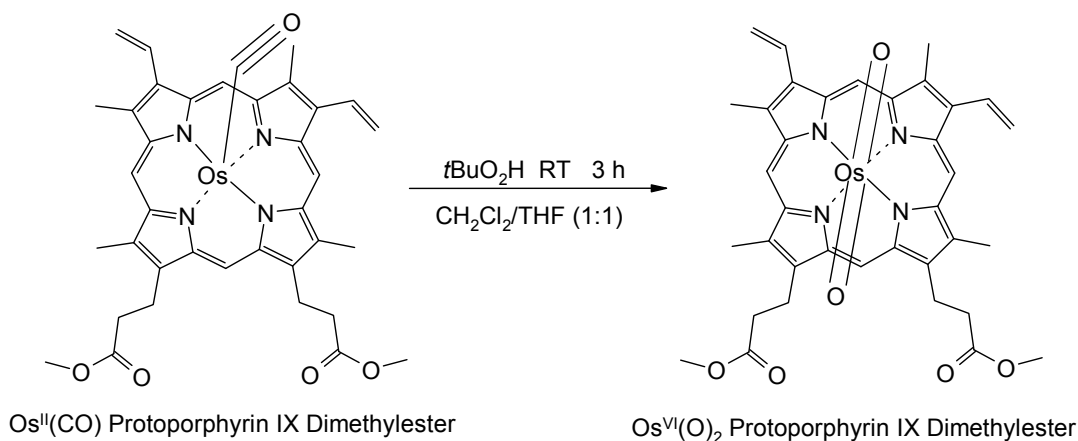


Abbildung 14 Reaktionsgleichung zur Entfernung des CO-Liganden.

#### 4.3.1.3. Reduktion zu $\text{Os}^{\text{III}}$ -Protoporphyrin IX-Dimethylester

Das sechswertige Os-Porphyrin wurde nach [189] reduziert. Dazu wurde ca. 30 mg  $\text{Os}^{\text{VI}}(\text{O})_2$ -Porphyrin in etwas Dimethylsulfoxid (DMSO; Fluka, Steinheim) gelöst und mit Tris/Borat-Puffer pH 8,0 versetzt. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur unter Stickstoff gerührt und für mehrere Stunden einem über 18 fachen Überschuss Natriumdithionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , Sigma-Aldrich, Steinheim) ausgesetzt. Nach der Reduktion wurde das Porphyrin mit Dichlormethan extrahiert.

#### 4.3.1.4. Verseifung des Os-Porphyrin-Dimethylesters

Os-Porphyrin-Dimethylester wurde in 10 ml THF gelöst, mit 10 ml 4 %iger wässriger KOH-Lösung versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur unter Stickstoff gerührt. Eine kleine Probe der Reaktionsmischung wurde zur Überprüfung des Verseifungsgrades mit Chloroform versetzt. Das Ausbleiben einer Färbung der Chloroform-Phase zeigt eine vollständige Verseifung an. Das THF wurde im Rotationsverdampfer entfernt und die wässrige Phase wurde mit HCl neutralisiert wodurch das Os-Porphyrin ausgefällt wurde.

### 4.3.2. apoHRP-Darstellung

Das Hämin wurde durch eine Modifikation der Methode nach Teale aus dem Protein extrahiert [195]. Dazu wurde 74,4 mg Meerrettich Peroxidase (Typ VI, Sigma-Aldrich, Steinheim) in ca. 20 ml eiskalter Natriumphosphatlösung (100 mM, pH 2,4) gelöst und bei 4 °C mit dem gleichen Volumen 2-Butanon ausgeschüttelt. Das Hämin löst sich im Butanon

während das Protein in der wässrigen Phase verbleibt. Die wässrige Phase wurde noch einige Male mit Butanon extrahiert bis die Butanon-Phase klar blieb.

Die apoHRP wurde 3 × gegen 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 × gegen H<sub>2</sub>O und 4 × gegen Tris/Borat-Puffer (10 mM, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0) dialysiert.

#### **4.3.3. OsHRP-Darstellung**

Das Os-Porphyrin wurde in DMSO gelöst und mit Tris/Borat-Puffer (10 mM, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0) versetzt. Ein ca. 20 facher Überschuss an Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> wurde unter Stickstoff zugegeben und das Gemisch für einige Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zum reduzierten Os-Porphyrin wurde apoHRP-Lösung gegeben. Das Gemisch wurde für 15 min gerührt und anschließend in einer Vakuumzentrifuge eingengt.

Die OsHRP wurde mit einer PD10 Säule (Sephadex G-25) von überschüssigem Os-Porphyrin getrennt. Dazu wurde die 5 cm lange Säule mit 2,5 ml Probe beladen. Die OsHRP wurde dann mit 2,5 – 3,5 ml Phosphatpuffer (3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 7,0) eluiert. Das überschüssige Os-Porphyrin wurde mit weiterem Phosphatpuffer von der Säule gewaschen. Beide Fraktionen wurden anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und bei -20 °C gelagert.

#### **4.3.4. Massenspektrometrie**

Die Massenspektren wurden am Interdisziplinären Zentrum für Massenspektrometrie von Biopolymeren (Institut für Biochemie und Biologie, Universität Potsdam) mit einem MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight) Gerät von Sophie Haebel aufgenommen. Die Proben wurden in Chloroform gelöst und für die Laser-Desorption auf eine Matrix aus 2',4',6'-Trihydroxyacetophenon (THAP, Sigma-Aldrich, Steinheim) aufgebracht. Die Detektion erfolgte mittels Time-Of-Flight-Analysator im Reflektionsmodus.

#### **4.3.5. Infrarot-Spektroskopie**

Die Infrarot-Spektren wurden am Institut für Chemie, Lehrstuhl für Organische Chemie I, der Universität Potsdam von Brigitte Hannemann aufgenommen.

#### **4.3.6. UV-VIS-Spektroskopie**

Die UV-VIS-Spektren wurden mit einem Shimadzu UV-2501 Photometer aufgenommen. Es wurden Quarz-Küvetten mit 1 cm Lichtweg verwendet.



### 4.3.7. Proteinbestimmung und Aktivitätstest

#### 4.3.7.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Protein-Konzentration wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt [196]. Dazu wurde aus einer BSA-Standardlösung (2 mg/ml, bovine serum albumin; Böhringer, Ingelheim) durch Verdünnen mit 0,9% NaCl-Lösung eine Verdünnungsreihe (2,5 bis 20 µg/ml) hergestellt. Diese wurden 1:1 mit Coomassie-Lösung (Pierce, Rockford, USA) gemischt und die Absorption bei 595 nm gemessen. Aus diesen Werten wurde eine Kalibrationsgerade ermittelt. Gleichzeitig wurden verschiedene Verdünnungen der Proben ebenfalls 1:1 Coomassie-Lösung gemischt und die  $A_{595\text{ nm}}$  gemessen. Mit Hilfe der Kalibrationsgeraden und dem Verdünnungsfaktor wurde die Protein-Konzentration in den unverdünnten Proben berechnet.

#### 4.3.7.2. Bestimmung der Peroxidase-Aktivität

##### 4.3.7.2.1. Aktivitätstest mit TMB

Jeweils 210 µl Citratpuffer (400 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 200 mM Zitronensäure, pH 4,4), 30 µl TMB-Lösung (1 mg/ml in EtOH; Tetramethylbenzidin; Merck, Darmstadt), 30 µl verdünnte Probe und 30 µl  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (10 mM) wurden vermischt und die Absorptionsänderung bei 620 nm bestimmt. Aus diesen Werten und der zuvor bestimmten Protein-Konzentration wurde die spezifische Aktivität berechnet. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  beträgt dabei 39 ml/µmol/cm.

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta A/\text{min} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Gesamtvolumen}}{\epsilon \times \text{Probenvolumen} \times \text{Schichtdicke} \times \text{Verstärkung}}$$

Gesamtvolumen = 0,3 ml, Probenvolumen = 0,03 ml, Schichtdicke = 0,6 cm, Verstärkung = 10.

##### 4.3.7.2.2. Aktivitätstest mit anderen Substraten

Die photometrische Messung der Peroxidase-Aktivität mit ABTS (2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfonsäure); Sigma-Aldrich, Steinheim), Hydrochinon (Sigma-Aldrich, Steinheim), Ferrocyanid (Sigma-Aldrich, Steinheim) und Ascorbinsäure (Merck, Darmstadt) erfolgte ähnlich der mit TMB. Enzym, Substrat und  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurden zusammengegeben und die Absorptionsänderung bei einer für das oxidierte Substrat charakteristischen Wellenlänge (ABTS 405 nm, Hydrochinon 427 nm, Ferrocyanid 419 nm, Ascorbinsäure 374 nm) wurde verfolgt.

Bei der elektrochemischen Aktivitätsmessung wurde eine Platin-Arbeits Elektrode auf ein Potential gesetzt, bei dem das reduzierte oder das oxidierte Substrat gemessen werden kann (ABTS 0 V, Hydrochinon -0,1 V, Ferrocyanid -0,1 V, Ascorbinsäure 0,6 V). Als Referenz wurde eine Ag/AgCl-Elektrode und als Gegenelektrode eine Platin-Wendel

verwendet. Substrat,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Enzym wurden nacheinander zusammengegeben (Messvolumen 1 ml), wobei unter Rühren die Stromänderung verfolgt wurde.

#### 4.3.8. Elektrochemie

##### 4.3.8.1. Elektrochemie in organischen Lösungsmitteln

Für die elektrochemischen Messungen in organischen Lösungsmitteln wurde eine Glaszelle verwendet. Als Lösungsmittel wurde Dichlormethan und als Leitsalz 100 mM Tetrabutylammonium-hexafluorophosphat ( $\text{NBu}_4\text{PF}_6$ , 387,44 g/mol; Sigma-Aldrich, Steinheim) oder 50 mM Tetrabutylammonium-tetrafluoroborat ( $\text{NBu}_4\text{BF}_4$ , 329,27 g/mol; Sigma-Aldrich, Steinheim) verwendet. Als Arbeitselektrode diente eine mit Aluminiumoxid (Korngrößen 1, 0,3 und 0,05  $\mu\text{m}$ ) polierte Glaskohlenstoff-Elektrode und als Gegenelektrode eine Platin-Wendel. Für die Referenzelektrode wurde ein Silber-Draht kurz mit Aceton und mit konzentrierter Salpetersäure gespült und anschließend für 1 h bei 1 V in 1 M KCl-Lösung chloriert. Vor den Messungen wurde die Elektrolytlösung mit DCM-gesättigtem  $\text{N}_2$  gespült um Sauerstoff zu entfernen. Dazu wurden Teflonschläuche verwendet. Als interner Standard wurde mit dieser Anordnung auch Ferrocen ( $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ , Sigma-Aldrich, Steinheim) vermessen. Als Potentiostat wurde eine CHI 750B electrochemical workstation (CH Instruments Inc., Austin, USA) verwendet.

##### 4.3.8.2. Elektrochemie in wässrigen Medien

Für die elektrochemischen Messungen mit den Porphyrin- und HRP-modifizierten Elektroden in wässrigen Medien wurde ein ähnlicher Aufbau verwendet wie für die elektrochemische Aktivitätsbestimmung. Die in der arbeitsgruppeninternen Werkstatt konstruierte und hergestellte 1 ml Batchzelle war mit einem Magnetrührer verbunden. Als Referenz wurde eine Ag/AgCl/1 M KCl-Elektrode und als Gegenelektrode eine Pt-Wendel verwendet. Um Sauerstoff zu entfernen wurde die Messlösung mit Stickstoff gespült. Als Potentiostat wurde eine CHI 750B electrochemical workstation (CH Instruments Inc., Austin, USA) verwendet.

##### 4.3.8.2.1. Os- und Fe-Porphyrin-modifizierte PG- und GC-Elektroden

20  $\mu\text{l}$  einer 0,3 mg/ml Porphyrin-Lösung (in 1 M NaOH) wurde auf eine mit Aluminiumoxid (Korngrößen 1, 0,3 und 0,05  $\mu\text{m}$ ) polierte PG- (pyrolytisches Graphit) bzw. GC- (Glaskohlenstoff) Elektrode aufgetropft. Die Elektrode wurde abgedeckt und über Nacht bei 4 °C getrocknet. Anschließend wurde sie mit Phosphat-Puffer (20 mM Kalium-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 6,0) kurz abgespült und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Als Messpuffer wurde der gleiche Phosphat-Puffer verwendet.

#### 4.3.8.2.2. HRP-modifizierte PG- und GC-Elektroden

10 bis 20  $\mu\text{l}$  einer 1 – 3 mg/ml HRP-Lösung (FeHRP, OsHRP) wurden auf eine polierte PG- bzw. GC- Elektrode aufgetropft. Die Elektrode wurde abgedeckt und über Nacht bei 4 °C getrocknet. Anschließend wurde sie mit Phosphat-Puffer (3 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 7,0) kurz abgespült und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Als Messpuffer wurde der gleiche Phosphat-Puffer verwendet.

#### 4.3.8.2.3. HRP-ddab-Film modifizierte PG- und GC-Elektroden

Eine wässrige Suspension von 0,01 M Didodecyldimethylammonium-Bromid (ddab) (Sigma-Aldrich, Steinheim) wurde in ein Ultraschallbad gehalten bis sie klar wurde. Eine 1 mg/ml HRP-Lösung (FeHRP, OsHRP) wurde 1:1 mit der klaren ddab-Suspension vermischt und für weitere 2 – 3 min ins Ultraschallbad gehalten. 10  $\mu\text{l}$  des Gemischs wurden dann auf eine mit Aluminiumoxid (Korngrößen 1, 0,3 und 0,05  $\mu\text{m}$ ) polierte PG- bzw. GC- Elektrode aufgetropft. Die Elektrode wurde abgedeckt und über Nacht bei 4 °C getrocknet. Anschließend wurde sie mit Phosphat-Puffer (3 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 7,0) kurz abgespült und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Als Messpuffer wurde der gleiche Phosphat-Puffer verwendet.

### 4.3.9. Kinetik der Reaktion von OsHRP mit Peroxiden

Die kinetischen Messungen wurden mit einem Shimadzu UV-2501 Photometer aufgenommen. Es wurde eine Quarz-Küvette mit 100  $\mu\text{l}$  Fassungsvermögen und 1 cm Lichtweg verwendet. Sie wurde auf 25 °C temperiert. OsHRP (Endkonzentration 0,1 mg/ml) und Peroxid (in verschiedenen Endkonzentrationen) wurden zusammengegeben und die Absorption bei 395 nm für 600 s aufgenommen. Als Peroxid wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Merck, Darmstadt) im Konzentrationsbereich von 2 bis 30 mM oder *tert*-Butylhydroperoxid (Sigma-Aldrich, Steinheim) im Konzentrationsbereich von 2 bis 14 mM verwendet. Als Puffer wurde Phosphat-Puffer (10 mM Phosphat, 20 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 9,0) oder Citrat-Puffer (10 mM Citrat, 20 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 4,0) verwendet. Es wurden jeweils 3 Messungen pro Peroxid-Konzentration durchgeführt.

Die Kurven wurden mit dem Programm Origin (Microcal Software, Northampton, USA) gefittet. Für den einfach-exponentiellen Fit wurde die Funktion „MnMolecular1“ (13) und für den doppelt-exponentiellen Fit die Funktion „ExpAssoc“ (14) verwendet. Gleichung 14 kann leicht in Gleichung 21, der eigentlichen Kinetik-Funktion, umgewandelt werden, indem die Summe aus  $y_0$ ,  $A_1$  und  $A_2$  aus (14) gleich B aus (21) und die Kehrwerte von  $t_1$  bzw.  $t_2$  aus (14) gleich  $k_{1,\text{obs}}$  bzw.  $k_{2,\text{obs}}$  aus (21) gesetzt werden.

$$y = A_1 - A_2 e^{-kx} \quad (13)$$

$$y = y_0 + A_1 \left(1 - e^{-x/t_1}\right) + A_2 \left(1 - e^{-x/t_2}\right) \quad (14)$$

#### 4.3.10. Spektroelektrochemie

Die spektroelektrochemischen Messungen wurden in einer Durchflusszelle durchgeführt, die in der arbeitsgruppeninternen Werkstatt konstruiert und hergestellt wurde. Für die elektrochemischen Messungen wurde ein PGSTAT30 Potentiostat von Autolab (EcoChemie, Utrecht, Niederlande) eingesetzt. Als Referenz wurde eine Ag/AgCl/1 M KCl-Elektrode und als Gegenelektrode das Edelstahl-Gehäuse der Messzelle verwendet. Arbeitselektrode war ein 200 nm dick mit Indiumzinnoxid (engl. indium tin oxide, ITO) beschichteter 4,5 × 1 cm großer Glasträger. Die spektroskopischen Messungen wurden nach dem ATR-Prinzip (abgeschwächte Totalreflektion, engl. attenuated total reflection) durchgeführt. Dazu wurde eine Lichtquelle von StellarNet (Tampa, USA) verwendet und das Licht über einen Lichtleiter und ein Prisma in den Glasträger eingekoppelt. Am anderen Ende des Trägers wurde das nicht absorbierte Licht wieder durch ein Prisma ausgekoppelt und über einen zweiten Lichtleiter zum Detektor (StellarNet, Tampa, USA) geleitet.

Der ITO beschichtete Glasträger wurde zur Reinigung über Nacht in eine kalt gesättigte KOH-Lösung in Isopropanol (Roth, Karlsruhe) gestellt. Vor dem Einbau in die Messzelle wurde der Träger je 10 min in 0,1 % SDS (Natrium-Dodecylsulfat, Sigma-Aldrich, Steinheim), Ethanol (Roth, Karlsruhe) und zweimal in Wasser Ultraschall ausgesetzt.

Die zusammengebaute Messzelle wurde mit Puffer (10 mM Phosphat, 20 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 9,0) gefüllt und am Detektor wurden nach Einstellen aller Lichteinstrahl-Winkel die Hell- und Dunkelspektren aufgenommen.

Für die Messung wurde 0,1 – 1 mg/ml OsHRP-Lösung in die Messzelle gegeben, für 10 – 30 min ein Potential angelegt und das Absorptionsspektrum aufgenommen.

## **5. Ergebnisse und Diskussion**

## 5.1. Teil A: Medizinische Studien

Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) in der Ausatemluft wurde in einer Reihe von Studien als ein möglicher nicht-invasiv messbarer Marker für Atemwegs-Erkrankungen vorgeschlagen. Als Hauptquellen des  $H_2O_2$  werden Leukozyten, vor allem neutrophile und eosinophile Granulozyten, vermutet [74, 78, 79, 82].

Während einer Chemotherapie wird die Zahl der Leukozyten im Blut stark beeinträchtigt. In einer Pilotstudie wurde untersucht, ob die  $H_2O_2$ -Menge in der Ausatemluft bei Brustkrebs-Patientinnen während einer Chemotherapie die Leukozyten-Zahl im Blut widerspiegelt (Abschnitt 5.1.1.). Als weiterer Parameter wurde hier auch Laktat in der Ausatemluft sowie im Blut gemessen. Laktat in der Ausatemluft kann dabei ebenfalls ein Marker für Lungenschädigungen sein [197].

Laktat im Blut wird in der Sportmedizin als Parameter zur Trainingsüberwachung verwendet. In einer Vorstudie wurde die Möglichkeit untersucht, ob sich diese invasive Messung durch eine nicht-invasive Bestimmung der Laktat-Menge in der Ausatemluft ersetzen lässt (Abschnitt 5.1.2.). Zusätzlich wurde hier auch die  $H_2O_2$ -Menge in der Ausatemluft gemessen.

### 5.1.1. Nicht-invasive Verlaufskontrolle der Chemotherapie

In dieser Pilotstudie zur nicht-invasiven Verlaufskontrolle der Chemotherapie von Brustkrebs-Patientinnen wurde bei insgesamt 19 Patientinnen, die nach einer Operation zur Entfernung eines Brustkrebses eine Chemotherapie bekamen, um eine Manifestierung einer Metastasierung zu verhindern, die Menge an ausgeatmetem  $H_2O_2$  in regelmäßigen Abständen während der gesamten Behandlung bestimmt und mit der entsprechenden Anzahl an Neutrophilen verglichen. Zeitgleich wurden die Menge an ausgeatmetem Laktat und die Laktat-Konzentration im Blut gemessen und miteinander und mit der Neutrophilenzahl verglichen.

#### 5.1.1.1. Ausgeatmetes $H_2O_2$ und Neutrophilenzahl

Die  $H_2O_2$ -Konzentration im Atemkondensat vor Beginn der Chemotherapie schwankte mit  $270 \pm 200$  nM sehr stark, was einen patientenspezifischen Wert vermuten lässt. Die sehr unterschiedlichen Literaturwerte für die  $H_2O_2$ -Konzentration im Atemkondensat bei gesunden Probanden, von  $0,01 \pm 0,03$  nM [73] über  $260 - 310$  nM [77-79] bis zu  $569 \pm 30$  nM [198], unterstützen diese Vermutung. Die mittlere Menge ausgeatmetes  $H_2O_2$  pro Liter Luft schwankte mit  $6,1 \pm 3,4$  pmol nicht ganz so stark und ist daher möglicherweise ein zuverlässigeres Maß.

Die mittlere Anzahl an Neutrophilen schwankte vor Beginn der Chemotherapie mit  $4,9 \pm 2,1 \text{ nl}^{-1}$  etwa genauso stark (43 – 56 %). Der Normalwert für die Neutrophilenzahl ist  $2,5 - 7,5 \text{ nl}^{-1}$ . Der mittlere Anfangswert der Patientinnen liegt also im Normalbereich.

Auch wenn bei jeder Patientin ein anderer Anfangswert gemessen wurde, war im Verlauf der Chemotherapie eindeutig ein Anstieg und Abfall der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration zu beobachten.

Auffällig war, dass sowohl kleinere als auch größere Werte als die Anfangskonzentration gemessen wurden. Bei den in der Literatur beschriebenen Anwendungen der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Messung im Atemkondensat wurden bei Patienten bisher nur gleich bleibende oder höhere Konzentrationen festgestellt. Bei akutem Asthma steigt der Wert auf 180 – 780 nM [74, 75], bei Bronchiektasen auf 870 – 1100  $\mu\text{M}$  [78, 79]. Bei einer leichten COPD ist die Menge des ausgeatmeten  $\text{H}_2\text{O}_2$  etwa gleich der bei gesunden Menschen, bei einer moderaten bis schweren Erkrankung ist dagegen ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen (680 – 960  $\mu\text{M}$  [77]).

Abbildung 15 zeigt ein Beispiel für den Vergleich der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im Atemkondensat und der Anzahl an neutrophilen Granulocyten im Blut für eine der 19 Patientinnen. Während der ersten vier Zyklen nehmen sowohl die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration als auch die Anzahl der Neutrophilen während des Zyklus ab und steigen kurz vor der nächsten Medikamentengabe wieder an.

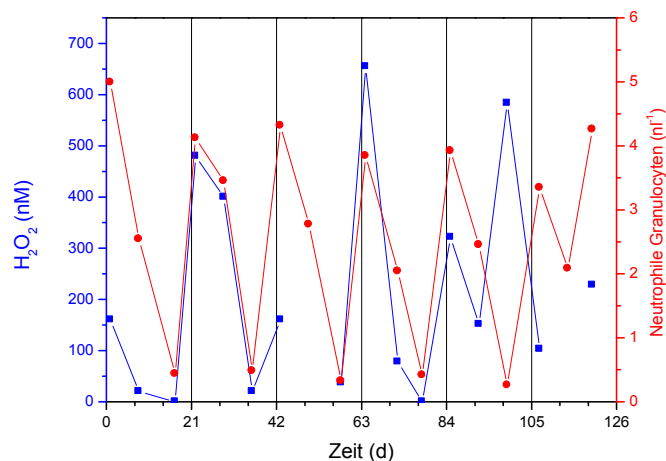


Abbildung 15 Vergleich der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im Atemkondensat mit der Neutrophilenzahl im Blut bei Patientin A, vertikale Linien zeigen den Beginn eines neuen Chemotherapie-Zyklus.

Allerdings war dieser Zusammenhang nicht bei allen Patientinnen zu sehen, so dass keine allgemeingültige Korrelation zwischen der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im Atemkondensat und der Anzahl der Neutrophilen im Blut nachgewiesen werden konnte. Auch eine Umrechnung auf die pro Liter ausgeatmete  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge führte zu keinem positiven Ergebnis.

Bei Bronchiektasen und COPD korreliert laut Literatur die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im EBC mit der Anzahl der Neutrophilen im induziertem Sputum (Korrelationsfaktor 0,9 [79] bzw. 0,83 [77]). Bei Lungenerkrankungen scheint ausgeatmetes  $\text{H}_2\text{O}_2$  demnach ein nicht-invasiv messbarer Parameter für die Neutrophilenzahl zu sein.

Die Neutrophilen produzieren vor allem dann  $\text{H}_2\text{O}_2$ , wenn sie aktiviert werden. Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration wird also durch die Anwesenheit von Bakterien, z.B. bei einer Entzündung, und anderen Zellen, die phagozytiert werden, erhöht. Eine von der Chemotherapie unabhängige zeitweilige Aktivierung der Neutrophilen kann also bewirken, dass der Verlauf der ausgeatmeten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge von der Anzahl der Neutrophilen abweicht. Eine Aufzeichnung von Infektionen und eine entsprechende Anpassung der gemessenen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen sind demnach sinnvoll.

Bei der Messung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im Atemkondensat spielen auch Faktoren, wie die Atemgeschwindigkeit oder die Luftfeuchtigkeit und Temperatur der Umgebung [61, 199], eine Rolle. Bei dieser Pilotstudie wurde nicht genau genug auf solche Einflussfaktoren geachtet, so dass dies mit ein Grund dafür sein konnte, dass keine Korrelation nachgewiesen werden konnte. Durch klimatisierte Umgebungsluft und eine stärkere Überwachung der Atemgeschwindigkeit der Patientinnen können Schwankungen der Messwerte durch diese Faktoren minimiert werden.

Die Menge an ausgeatmetem  $\text{H}_2\text{O}_2$  eignet sich daher möglicherweise nicht als alleiniger Marker für eine Verlaufskontrolle der Chemotherapie von Brustkrebs-Patientinnen. Ob  $\text{H}_2\text{O}_2$  zusammen mit anderen nicht-invasiv messbaren Markern zur Verlaufskontrolle geeignet ist, muss in einer anderen Studie überprüft werden.

#### 5.1.1.2. Ausgeatmetes Laktat, Laktat im Blut und Neutrophilenzahl

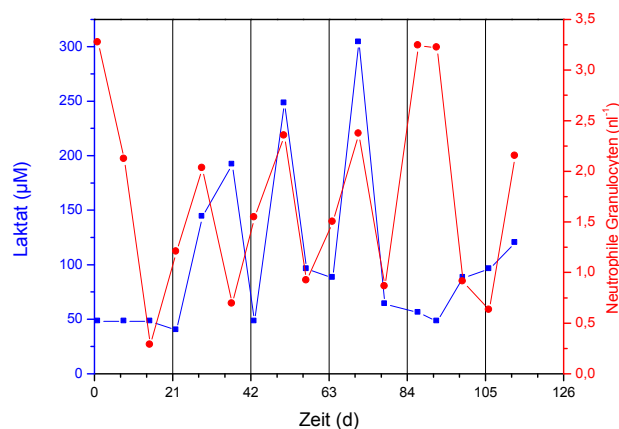


Abbildung 16 Vergleich der Laktat-Konzentration im Atemkondensat mit der Neutrophilenzahl im Blut bei Patientin B, vertikale Linien zeigen den Beginn eines neuen Chemotherapie-Zyklus.



Die Laktat-Konzentration im Atemkondensat vor Beginn der Chemotherapie schwankte mit  $96 \pm 61 \mu\text{M}$  ebenfalls sehr stark. Die mittlere Menge an pro Liter ausgeatmetem Laktat war mit  $1,5 \pm 0,6 \text{ nmol}$  nicht stabiler. Die Laktat-Konzentration im Blut betrug im Mittel  $2,4 \pm 1,1 \text{ mM}$ .

Abbildung 16 zeigt ein Beispiel für den Vergleich der Laktat-Konzentration im Atemkondensat und der Anzahl an neutrophilen Granulocyten im Blut für eine Patientin. Bei dieser Patientin nehmen während zwei der sechs Zyklen die Laktat-Konzentration im EBC und die Anzahl der Neutrophilen zeitgleich zu bzw. ab. Bei anderen Patientinnen war keine Ähnlichkeit im Verlauf der Laktat-Konzentration und der Neutrophilenzahl erkennbar. Auch nach Umrechnung auf die pro Liter ausgeatmete Laktat-Menge war keinerlei Korrelation erkennbar.

Die Laktat-Konzentration im Atemkondensat scheint bei dieser Studie auch nicht mit der Blut-Laktat-Konzentration zu korrelieren. Die Umrechnung auf pro Liter ausgeatmete Laktat-Menge führte hier ebenfalls zu keinem erkennbaren Zusammenhang.

Ausgehend von diesen Daten scheint Laktat also kein geeigneter Marker für eine Verlaufskontrolle der Chemotherapie von Brustkrebspatientinnen zu sein.

### **5.1.2. Nicht-invasive Bestimmung der anaeroben Schwelle**

Zur Ermittlung der individuellen anaeroben Schwelle einer Person wird in der Sportmedizin die Laktat-Konzentration im Blut gegen die Belastungsintensität aufgetragen. Die Belastungsintensität wird dabei z.B. als Widerstand eines Fahrradergometers angegeben.

Zur Bestimmung der Laktat-Konzentration wird meist Kapillarblut aus dem Ohrläppchen entnommen. Auch wenn durch eine Konzentrierung auf die körperliche Anstrengung die Entnahme meist als schmerzlos empfunden wird, ist es doch immer noch eine invasive Methode.

Diese Vorstudie diente dazu, zu untersuchen, ob eine Studie zur nicht-invasiven Bestimmung der anaeroben Schwelle durch ausgeatmetes Laktat oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  Erfolg versprechend wäre. Gleichzeitig wurde die bei Labormessgeräten meist angewandte Methode der Laktat-Messung im hämolysierten Blut mit der bei für Feldmessungen geeigneten Handgeräten üblichen Laktat-Messung im Vollblut verglichen.

#### *5.1.2.1. Laktat im Blut und ausgeatmetes Laktat*

Die pro Liter ausgeatmete Menge an Laktat scheint hier im Allgemeinen mit der Laktat-Konzentration im Blut anzusteigen (Abbildung 17). Allerdings war nicht bei allen Probanden ein so direkter Zusammenhang zwischen ausgeatmetem Laktat und Blut-Laktat wie bei dem in Abbildung 17 dargestellten Fall zu sehen.

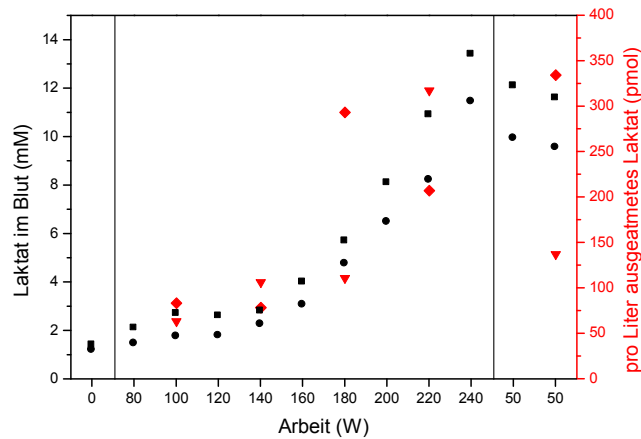


Abbildung 17 Vergleich der Laktat-Konzentration im Blut mit der ausgearmeten Laktat-Menge bei Proband A, (■) Laktat im Vollblut (LaktatProfi3000), (●) Laktat im Hämolsat (BIOSEN S\_line), (▼) ausgearmetes Laktat (LaktatProfi3000), (◆) ausgearmetes Laktat (ECoCheck).

Die Messung von ausgearmetem Laktat könnte also grundsätzlich zur Bestimmung der anaeroben Schwelle und zur Trainingsüberwachung herangezogen werden. Allerdings ist diese Methode weniger genau als die Messung von Blut-Laktat und der zurzeit nötige Aufwand noch zu groß. Vor einer weiterführenden Studie sollte also eine Methode entwickelt werden, die eine Messung des pro Liter Luft ausgearmeten Laktats ohne eine Atemkondensatsammlung über mehrere Minuten ermöglicht. Die Empfindlichkeit der Laktat-Sensoren sollte erhöht und die untere Detektionsgrenze erniedrigt werden.

#### 5.1.2.2. Laktat im Blut und ausgearmetes $H_2O_2$

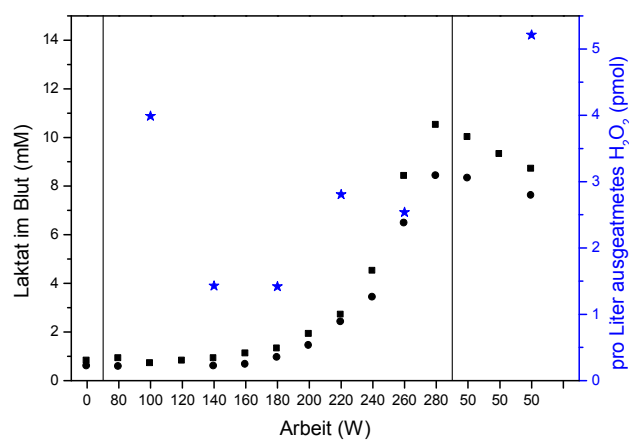


Abbildung 18 Vergleich der Laktat-Konzentration im Blut mit der ausgearmeten  $H_2O_2$ -Menge bei Proband B, (■) Laktat im Vollblut (LaktatProfi3000), (●) Laktat im Hämolsat (BIOSEN S\_line), (★) ausgearmetes  $H_2O_2$  (ECoCheck).

Die Menge an ausgeatmetem  $H_2O_2$  steigt im Allgemeinen ebenfalls mit der Belastung an, allerdings nicht so deutlich wie die Laktat-Menge (Abbildung 18). Auch lag die Konzentration im Atemkondensat oft unter dem Detektionslimit, so dass meist nur wenige Punkte gemessen werden konnten.  $H_2O_2$  ist also für eine Bestimmung der anaeroben Schwelle nicht geeignet.

### 5.1.2.3. Laktat im Vollblut und Hämolyt

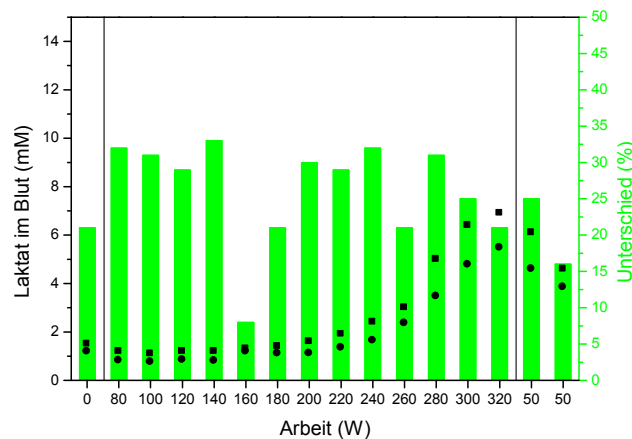


Abbildung 19 Vergleich der Laktat-Konzentration im Vollblut und Hämolyt bei Proband C, (■) Laktat im Vollblut (LaktatProfi3000), (●) Laktat im Hämolyt (BIOSEN S\_line), (■) Unterschied zwischen Vollblut und Hämolyt.

Beim Vergleich der Laktat-Konzentration im Vollblut und im Hämolyt fällt auf, dass im Vollblut ein leicht höherer Wert gemessen wird (Abbildung 19). Dieser Unterschied rührt daher, dass bei der Messung im Vollblut die Laktat-Konzentration im Plasma ermittelt wird. Das Hämolyt ist aber eine Mischung aus Blutplasma und Cytosol vor allem der Erythrocyten. Die Laktat-Konzentration in den Erythrocyten ist nur etwa 50 – 60 % so hoch wie im Plasma [200-202]. Der Unterschied zwischen der Laktat-Konzentration im Vollblut ( $L_P$ ) und im Hämolyt ( $L_H$ ) setzt sich also zusammen aus dem Verhältnis ( $V_{E:P}$ ) der Konzentration im Plasma ( $L_P$ ) und in den Erythrocyten ( $L_E$ ) und dem Anteil der Erythrocyten am Blutvolumen, dem Hämatokrit ( $Hk$ ). Es ergibt sich folgende Berechnung:

$$\begin{aligned} \text{Unterschied} &= 1 - \frac{L_H}{L_P} = 1 - \frac{(1 - Hk) \times L_P + Hk \times L_E}{L_P} \\ &= Hk - Hk \times \frac{L_E}{L_P} = Hk \times (1 - V_{E:P}) \end{aligned}$$

Wie in Abbildung 19 zu sehen, bleibt dieser Unterschied während des Trainings nicht konstant. Dies kann an einem schwankenden Hämatokrit-Wert, einer schwankenden Laktat-Verteilung zwischen Erythrocyten und Plasma oder an beiden liegen.

Es ist bekannt, dass die MCT-Dichte in der Muskel- sowie in der Erythrocytenmembran durch Training erhöht wird. MCT steht für Monocarboxylat-Transporter, ein Laktat/H<sup>+</sup>-Co-Transporterprotein, das in mehreren Isoformen vorkommt, wobei vor allem MCT1 und MCT4 für den Laktat-Transport bei Muskelzellen und Erythrocyten verantwortlich ist [203]. Die Laktat-Transport-Kapazität zwischen Muskel und Blut sowie zwischen Blutplasma und Erythrocyten ist bei trainierten Menschen also höher als bei untrainierten.

In einer Studie von Adachi *et al.* zeigte sich, dass sich der Hämatokrit bei untrainierten Menschen unter Belastung erhöht, bei trainierten Menschen dagegen nicht [204]. In der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studie konnte keine Abhängigkeit der Änderung des Unterschieds zwischen der Laktat-Konzentration im Vollblut und im Hämolysat vom Trainingszustand der Probanden festgestellt werden. Dies legt nahe, dass sich  $V_{E:P}$  abhängig vom Trainingszustand unterschiedlich ändert.

Eine auf die Untersuchung des Unterschiedes zwischen der Laktat-Konzentration im Vollblut und im Hämolysat abgezielte Studie, die den Hämatokrit mit einbezieht, kann einen besseren Einblick in die Physiologie des Blutes während einer Belastungsphase geben.

## 5.2. Teil B: Pyrolysiertes CoTMPP als Elektrodenmaterial

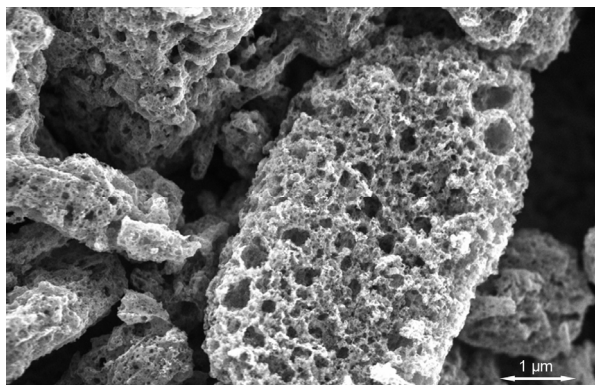


Abbildung 20 REM-Aufnahme einer Modifikation von pyrolysiertem, schwefelhaltigem CoTMPP (2 kV und 30.000 fache Vergrößerung; Bild vom Hahn-Meitner-Institut, Berlin [205]).

Die elektrische Leitfähigkeit ihrer Kohlenstoffmatrix und die Metallzentren machen pyrolysierte Metall Tetramethoxyphenylporphyrine (MeTMPPs, Abbildung 20) zu guten Kandidaten für ein Elektrodenmaterial mit einer hohen Elektronentransferrate zu Redoxproteinen. In diesem Abschnitt wurden Modifikationen von pyrolysierten MeTMPPs, vor allem CoTMPPs, untersucht, um ein Material mit einer hohen Elektronentransferrate zur Meerrettich Peroxidase zu finden.

Dazu wurden Paste-Elektroden aus diesen Materialien hergestellt. Pyrolysierte MeTMPPs sind Pulver mit Korngrößen im  $\mu\text{m}$ -Bereich [112] und lassen sich gut zu Pasten verarbeiten. Durch das Vermengen von Elektrodenmaterial und Enzym lässt sich auch einfach ein enger Kontakt zwischen beiden herstellen.

### 5.2.1. Verschiedene Kohlenstoffmaterialien für die Reduktion von $\text{H}_2\text{O}_2$

Elektrodenmaterial	Basismaterial	Zusätze	Oberflächengröße [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]
CoTMPP/BP	Black Pearls	1 % CoTMPP	640
$\text{FeC}_2\text{O}_4/\text{CoTMPP}$	CoTMPP	$\text{FeC}_2\text{O}_4$ (10 % Fe)*	400 – 700
$\text{FeC}_2\text{O}_4/\text{S}/\text{CoTMPP}$	CoTMPP	$\text{FeC}_2\text{O}_4$ (1 % Fe)*, 3 % S *	
Pt/C **	Kohlenstoff	20 % Pt *	
FeTMPPCI/BP	Black Pearls	FeTMPPCI (2 % Fe)*	600 – 800
$\text{SnC}_2\text{O}_4/\text{CoTMPP}$	CoTMPP	$\text{SnC}_2\text{O}_4$ (10 % Sn)*	

Tabelle 3 Materialien des ersten Screenings, (\*) Gew.-%, (\*\*) Referenzmaterial von E-TEK; ([205]).

Sechs verschiedene Materialien, davon fünf pyrolysierte MeTMPP-Derivate, wurden auf Hintergrundaktivität, ihre Effizienz sich in einem heterogenen Elektronentransferprozess direkt mit der HRP und mit Tetrathiafulvalen (TTF) als „mobilem“ Mediator zu beteiligen, getestet. Um die Aktivität zu bestimmen, wurde der Reduktionsstrom für  $\text{H}_2\text{O}_2$  gemessen. Die getesteten Materialien sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

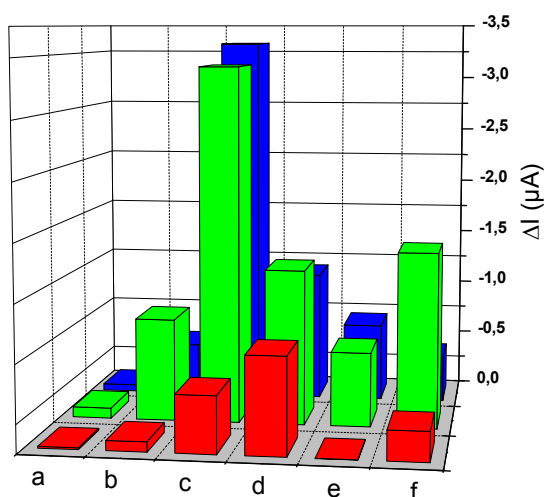


Abbildung 21 Vergleich des Reduktionsstroms für 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei Paste-Elektroden aus verschiedenen Materialien (Tris Puffer,  $-0,2\text{ V vs. Ag/AgCl}$ ): (a) CoTMPP/BP, (b)  $\text{FeC}_2\text{O}_4/\text{CoTMPP}$ , (c)  $\text{FeC}_2\text{O}_4/\text{S}/\text{CoTMPP}$ , (d) Pt/C, (e) FeTMPPCl/BP, (f)  $\text{SnC}_2\text{O}_4/\text{CoTMPP}$ ; (rot) ohne Zusätze, (grün) mit HRP, (blau) mit HRP und TTF.

### 5.2.1.1. Hintergrundaktivität

Die meisten der getesteten Materialien waren auch ohne Zusatz von Enzym in der Lage,  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei  $-0,2\text{ V}$  (Ag/AgCl) zu reduzieren (Abbildung 21, rot). Das Pt/C-Material (E-TEK) war dabei am effizientesten und zeigte einen Reduktionsstrom von  $0,8\ \mu\text{A}/\text{mM}$  (Abbildung 21d, rot). Da Platin ein bekannter Katalysator für die Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist, wurde dieses Material als Referenz mit getestet. In Gegenwart von Eisenoxalat und Schwefel ( $\text{FeC}_2\text{O}_4/\text{S}/\text{CoTMPP}$ , Abbildung 21f, rot,  $0,2\ \mu\text{A}/\text{mM}$ ) oder nur Eisenoxalat ( $\text{FeC}_2\text{O}_4/\text{CoTMPP}$ , Abbildung 21b, rot,  $0,1\ \mu\text{A}/\text{mM}$ ) pyrolysiertes CoTMPP waren ebenfalls in der Lage  $\text{H}_2\text{O}_2$  ohne Zusatzstoffe bei  $-0,2\text{ V}$  zu reduzieren.

### 5.2.1.2. $\text{H}_2\text{O}_2$ Reduktion mit HRP

Wenn HRP an pyrolysierten MeTMPP Derivaten (Abbildung 21a-c,e-f, grün) adsorbiert wird, erhöht sich der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Reduktionsstrom um einen Faktor von 6 bis 10 verglichen mit dem korrespondierenden unmodifizierten Material (Abbildung 21a-c, e-f, rot). Der Grund dafür ist,

dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  effizient durch HRP reduziert wird, welches wiederum an dem pyrolysierten Material reduziert wird, entweder durch DET oder durch Komponenten des Materials, wahrscheinlich Metallkomplexe wie die  $\text{MeN}_4$ -Zentren [112-115], die als Mediator zwischen Enzym und Elektrode fungieren (Abbildung 5, Peroxidase Zyklus).

Der höchste Reduktionsstrom wurde durch  $\text{FeC}_2\text{O}_4/\text{S}/\text{CoTMPP}$  erreicht ( $3,2 \mu\text{A}/\text{mM}$ , Abbildung 21c). Zusatz von Metalloxalaten und Schwefel vor der Pyrolyse verstärkt also den Elektronentransfer vom TMPP Material zur HRP. Ob dies auf die ungewöhnlich große Oberfläche zurückzuführen ist oder auf günstige molekulare Strukturen und Oberflächengruppen der Kohlenstoffmatrix, kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht entschieden werden.

Wenn HRP auf dem Pt/C-Material adsorbiert wird (Abbildung 21d, grün), steigt der Reduktionsstrom nur auf ein etwa 1,5 faches des korrespondierenden Materials (Abbildung 21d, rot).

#### 5.2.1.3. $\text{H}_2\text{O}_2$ Reduktion mit HRP und TTF als Mediator

Zusatz von Tetrathiafulvalen (TTF) als Mediator erhöhte den Reduktionsstrom nur geringfügig (Abbildung 21, blau), im Gegensatz zu Graphitpaste-Elektroden [98]. Es scheint also, dass fast alle aktiven Enzymmoleküle im DET-Kontakt mit dem Elektrodenmaterial stehen, d. h. dass ein Überschuss an internem Mediator vorhanden ist. Bisher konnte eine so hohe Effizienz nur mit rekombinanter HRP (bis zu 100 % DET) [99] oder mit Peroxidase aus anderen Quellen, wie Süßkartoffel (91 % DET) oder Tabak (68 % DET) [102], beobachtet werden.

### 5.2.2. Maximaler Elektronentransfer ohne Zusatz eines Mediators

Aus dem ersten Screening konnten zwei Schlussfolgerungen gezogen werden. (i) Zusatz von Mediatoren wie TTF erleichtern den Elektronentransfer von pyrolysierten Metall TMPP Derivaten zur HRP nicht. (ii) Die Elektronentransferrate kann durch Zusatz von Metalloxalaten und Schwefel während der Pyrolyse erhöht werden.

#### 5.2.2.1. Vergleich mit in der Literatur beschriebenen Materialien

Ein Vergleich zwischen  $\text{FeC}_2\text{O}_4/\text{S}/\text{CoTMPP}$  ( $3,2 \mu\text{A}/\text{mM}$ , Abbildung 21c, Abbildung 22) und  $\text{CoTMPP}/\text{BP}$  ( $0,1 \mu\text{A}/\text{mM}$ , Abbildung 21a, Abbildung 22), einem Material, ähnlich dem von Gamburgzev *et al.* verwenden [116-119], zeigt, dass der Zusatz von Eisenoxalat und Schwefel die Elektronentransferrate signifikant erhöht (Abbildung 21a und c, Abbildung 22). Ein wesentlicher Unterschied zwischen diesen Proben ist die sehr viel größere Oberfläche des mit Oxalat und Schwefel behandelten Materials. Dies legt nahe, dass die Morphologie des Materials eine entscheidende Rolle im DET hat.

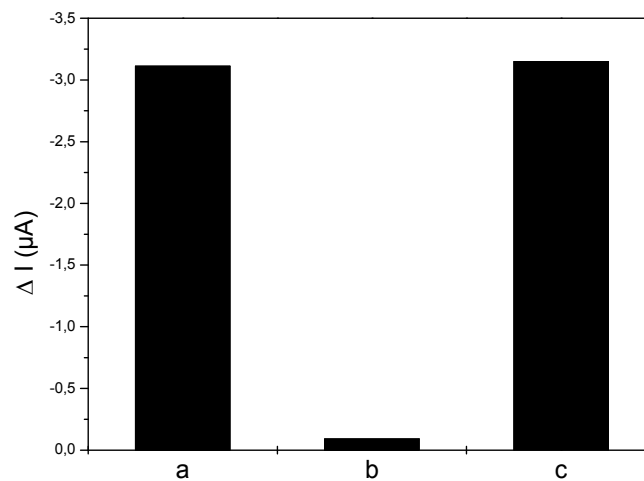


Abbildung 22 Vergleich des Reduktionsstroms für 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei verschiedener Paste-Elektroden (Tris Puffer, -0,2 V vs. Ag/AgCl), (a) Graphit mit HRP und TTF, (b) CoTMPP/BP mit HRP, (c)  $\text{FeC}_2\text{O}_4/\text{S}/\text{CoTMPP}$  mit HRP.

$\text{FeC}_2\text{O}_4/\text{S}/\text{CoTMPP}$  hat zusammen mit HRP etwa die gleiche Fähigkeit,  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu reduzieren wie Graphit zusammen mit HRP und TTF (3,2  $\mu\text{A}/\text{mM}$  und 3,1  $\mu\text{A}/\text{mM}$ , Abbildung 22). Da dieses Material ebenfalls die höchste Effizienz besitzt  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu reduzieren, wurde für weitere Optimierungsschritte von diesem Material ausgegangen.

#### 5.2.2.2. $\text{H}_2\text{O}_2$ -Reduktion und Paraffinöl-Menge

Bei der Präparation der Paste-Elektroden wurde Paraffinöl als Bindemittel verwendet. Paraffinöl ist nicht elektrisch leitfähig und kann als Isolator wirken. Bei den üblichen Protokollen zur Paste-Elektroden-Herstellung besteht die fertige Elektrode bis zu 33 % aus Paraffinöl. Bei diesen Verfahren ist es wichtig, dass Enzym und Mediatoren vor dem Paraffinöl mit dem Elektrodenmaterial vermischt werden, da sonst kann das Öl den Elektronentransfer blockieren kann [107]. Eine Messung des Widerstandes des Elektrodenmaterial-Gemischs ergab für Graphit-Pasten 100 – 200  $\Omega$ . Bei  $\text{FeC}_2\text{O}_4/\text{S}/\text{CoTMPP}$ -Pasten betrug der Widerstand 900  $\Omega$  und mehr. Das Paraffinöl scheint also den Elektronenfluss bei  $\text{FeC}_2\text{O}_4/\text{S}/\text{CoTMPP}$ -Pasten wesentlich stärker zu behindern. Durch Reduktion des Paraffinöl-Gehalts auf etwa 13 % konnte der Widerstand auf 5 – 10  $\Omega$  verringert werden ohne dass der Bindemittel-Effekt des Öls verloren ging. Diese Reduktion des Paraffinöl-Gehalts hatte auch zur Folge, dass es keine Rolle mehr spielte, ob das Enzym vor oder nach dem Öl zum Elektrodenmaterial gegeben wurde. Auch konnte die Empfindlichkeit von 3,2  $\mu\text{A}/\text{mM}$  (Abbildung 22) auf  $4,0 \pm 0,02 \mu\text{A}/\text{mM}$  (Abbildung 23) erhöht werden, wobei gleichzeitig das Messpotential von -0,2 V (Abbildung 22) auf -0,05 V (Abbildung 23) verringert wurde.



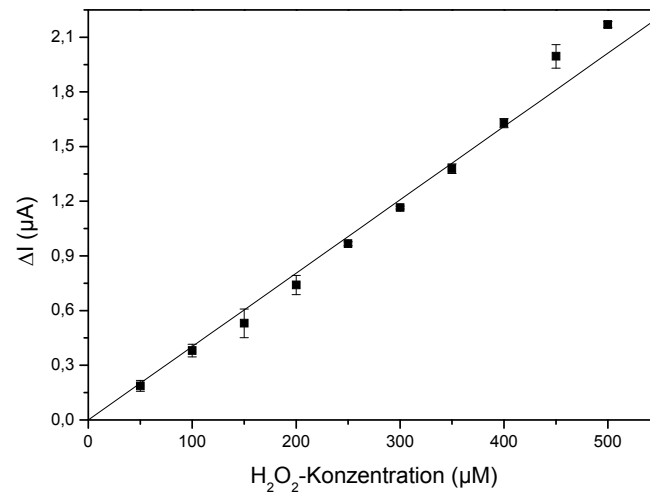


Abbildung 23 Konzentrationsabhängigkeit des Reduktionsstroms von  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;  $\text{FeC}_2\text{O}_4/\text{S}/\text{CoTMPP}$ ; Phosphat Puffer;  $-0,05\text{ V vs. Ag/AgCl}$ ;  $n = 6$ .

Die erhaltenen Signale waren über mehr als 25 Wiederholungsmessungen reproduzierbar, aber nach Lagerung über Nacht im Trockenen signifikant geringer (Abbildung 24). Alle Elektroden wurden daher nur für einen Tag verwendet. Die Reproduzierbarkeit für eine Serie von Elektroden lag im Bereich von 5 – 10 %.

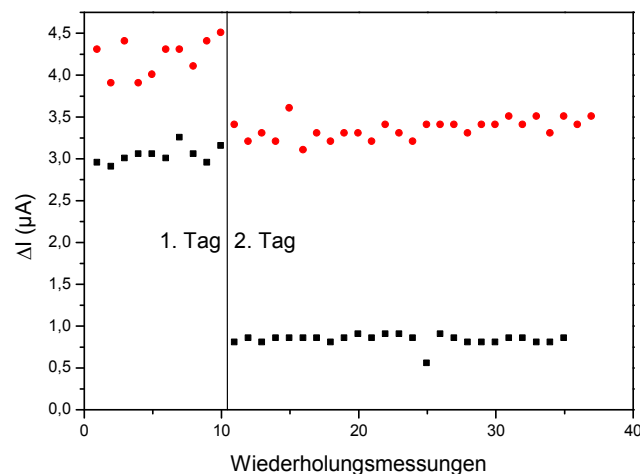


Abbildung 24 Stabilität der CoTMPP-Paste-Elektroden;  $\text{FeC}_2\text{O}_4/\text{S}/\text{CoTMPP}$ ; HRP absorbiert aus 2 mg/ml (■) bzw. 20 mg/ml (●) -Lösung; 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Phosphat Puffer;  $-0,05\text{ V vs. Ag/AgCl}$ .

### 5.2.3. Einfluss von Schwefel auf den Elektronentransfer

Um herauszufinden, was  $\text{FeC}_2\text{O}_4/\text{S}/\text{CoTMPP}$ -Material zu einem guten Partner für reagenzlose Peroxid-Messungen mit HRP macht, wurden eine Reihe von ähnlichen Materialien getestet, die durch Pyrolyse von CoTMPP in Gegenwart von unterschiedlichen Mengen an Eisenoxalat und Schwefel hergestellt wurden, wodurch verschiedene Morphologien der konditionierten Endmaterialien entstanden. Zum  $\text{FeC}_2\text{O}_4/\text{S}/\text{CoTMPP}$ -Material wurde zusätzlich zum Eisenoxalat vor der Pyrolyse Schwefel zugegeben. Da beim  $\text{FeC}_2\text{O}_4/\text{CoTMPP}$ -Material ebenfalls Eisenoxalat bei der Pyrolyse zugegeben wurde, ist es möglich, dass der Schwefel die Fähigkeit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu reduzieren verstärkt.

Zusatz an S [g]	Verbrennungsanalyse				Neutronenaktivierungs- analyse	
	C [%]	N [%]	S [%]	H [%]	Fe [%]	Co [%]
0,00	77,40	1,25	0,89	0,53	12,9	0,62
0,08	73,28	4,62	3,42	1,50	1,9	0,17
0,13	70,42	4,72	3,31	1,34	1,2	0,14
0,26	68,58	4,57	3,48	1,33	2,0	0,20
0,33	65,26	4,30	5,70	1,38	1,5	0,31

Tabelle 4 Elementaranalyse der  $\text{FeC}_2\text{O}_4/\text{S}/\text{CoTMPP}$ -Materialien bei verschiedenen S-Zusätzen ([205]).

Diese Hypothese wurde durch Zugabe von unterschiedlichen Mengen an Schwefel vor der Pyrolyse überprüft. Weiterhin wurden Materialien nach verschiedenen Nachbehandlungen zur Oberflächenmodifikation (Abschnitt 5.2.4.) und Materialien mit unterschiedlichen spezifischen Oberflächen und Porengrößen (Abschnitt 5.2.5.) getestet.

In Tabelle 4 sind Ergebnisse der Analyse des C-, N-, S- und H-Gehalts sowie des Fe- und Co-Anteils in Abhängigkeit von der zugegebenen Schwefel-Menge aufgelistet.

Elektroden aus Materialien mit verschiedenen Schwefel-Gehalten wurden hergestellt. Nach Immobilisation von HRP wurde der Reduktionsstrom in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  gemessen (Abbildung 25). Verglichen mit der Menge an Schwefel, die vor der Pyrolyse zugegeben wurde, kann kein erkennbarer Einfluss beobachtet werden. Nur das Material mit einer Schwefelzugabe von 0,08 g zeigt eine signifikant höheres Signal als die anderen ( $10,2 \mu\text{A}/\text{mM}$ , Abbildung 25). Wie später erklärt werden wird, ist dies jedoch wahrscheinlich nicht auf die Schwefelmenge, sondern auf die Porengröße zurückzuführen (Material F, siehe Abschnitt 5.2.5., Abbildung 27 und Abbildung 28).

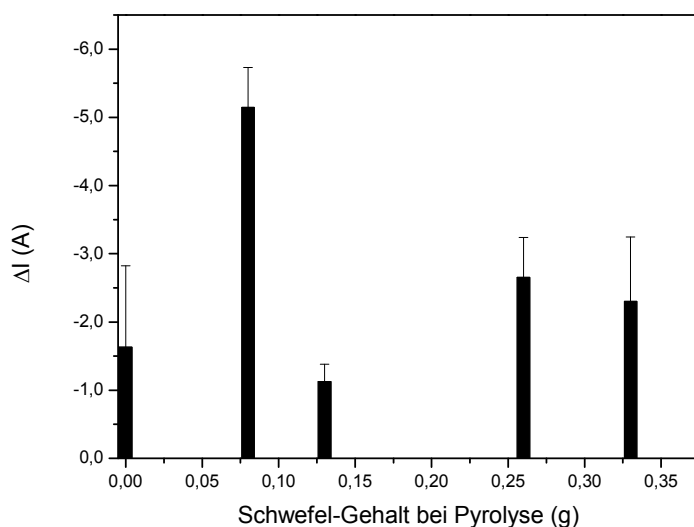


Abbildung 25 Abhängigkeit des Reduktionsstroms für 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  vom Schwefel-Gehalt bei der Pyrolyse (Phosphat Puffer,  $-0,05$  V vs. Ag/AgCl,  $n = 6$ ).

#### 5.2.4. Chemische Behandlung nach der Pyrolyse

Es wurde gezeigt, dass sauerstoffhaltige Oberflächengruppen den Elektronentransfer zwischen HRP und Kohlenstoffmaterial beschleunigen können [107]. Daher ist es interessant zu sehen, wie chemische Modifikationen der CoTMPP-Materialien die Elektronentransferrate zur HRP beeinflussen. Deshalb wurde der Einfluss von verschiedenen Nachbehandlungen zur Oberflächenmodifikation auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Reduktion untersucht, um eine höhere Empfindlichkeit für die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Messung zu erreichen.

Behandlung mit	Neutronen-Aktivierungsanalyse		Gassorption		XPS-Messungen	
	Co *	Fe *	BET **	Mikroporen **	O/C	S/C
ohne (A)	0,66	2,7	405,5	0	0,19	0,01
$\text{CO}_2$	1,14	3,8	1428,7	155,5	0,21	0,03
$\text{N}_2$	0,74	3,3	612,1	76,95		
ohne (B)	0,97	2,9	765,72	0	0,19	0,01
$\text{HNO}_3$	0,14	0,4	641,38	390		
$\text{SO}_2$	0,13	0,58	nicht vorhanden		0,25	0,15

Tabelle 5 Ausgewählte Eigenschaften der nachbehandelten Materialien, (\*) Gew.-% (\*\*) [ $\text{m}^2/\text{g}$ ] ([205]).

Dazu wurde ein Material (Material A)  $\text{CO}_2$  bzw.  $\text{N}_2$  ausgesetzt. Ein anderes Material (Material B) wurde mit  $\text{HNO}_3$  bzw.  $\text{SO}_2$  behandelt. Einige Eigenschaften der so behandelten Materialien sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Mit jedem der nachbehandelten Materialien wurden Elektroden hergestellt. Nach Immobilisation von HRP wurde der Reduktionsstrom in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  gemessen (Abbildung 26). Behandlung mit Salpetersäure verhinderte die Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  vollständig (Abbildung 26e).  $\text{CO}_2$  und  $\text{SO}_2$  Behandlung verminderten den Reduktionsstrom drastisch (Abbildung 26b bzw. f). Nur  $\text{N}_2$  Behandlung inhibierte den Elektronentransfer nicht, verbesserte ihn aber auch nicht (Abbildung 26c).

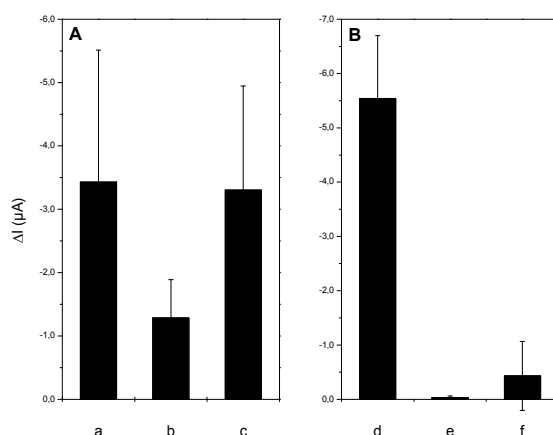


Abbildung 26 Abhängigkeit des Reduktionsstroms für 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  von chemischer Behandlung nach Pyrolyse (Phosphat Puffer, -0,05 V vs. Ag/AgCl,  $n = 6$ ), (A) Material A, (B) Material B, (a) und (d) unbehandelt, (b) behandelt mit  $\text{CO}_2$  bei 750 °C für 30 min, (c) behandelt mit  $\text{N}_2$  bei 750 °C für 30 min, (e) behandelt mit 8 M  $\text{HNO}_3$  bei 130 °C für 4 h, (f) behandelt mit  $\text{SO}_2$  bei 750 °C für 10 min.

Laut Literatur führt Oxidation in  $\text{HNO}_3$  zur Bildung von Carboxylgruppen auf der Oberfläche des Materials [206]. Gleichzeitig wird aber Metall entfernt und Metall-Stickstoff-Zentren zerstört. Dies ist in Tabelle 5 daran zu erkennen, dass bei der Neutronen-Aktivierungsanalyse nur 0,14 bzw. 0,4 Gew.-% Co und Fe nachgewiesen werden konnten, im Gegensatz zu 0,97 und 2,9 Gew.-% vor der Nachbehandlung. Das Fehlen jeglicher  $\text{H}_2\text{O}_2$  Reduktion bei diesem Material legt nahe, dass diese Metall-Stickstoff-Zentren oder zumindest das Metall eine wichtige Rolle im Elektronentransfermechanismus spielen.

Oxidation mit  $\text{SO}_2$  führt scheinbar zu einer sauerstoffreichen Oberfläche und zum Einbau von Schwefel in das Material (Tabelle 5). Wie bereits gezeigt (siehe Abschnitt 5.2.3, Abbildung 25), scheint die Verwendung von Schwefel keinen Einfluss auf die Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu haben. Eine sauerstoffreiche Oberfläche sollte laut Literatur [33] den

Elektronentransfer beschleunigen, aber bei diesen Materialien scheint das Gegenteil der Fall zu sein.

Oxidation mit CO<sub>2</sub> erhöht die spezifische Oberfläche drastisch (Tabelle 5). Der Einfluss der spezifischen Oberfläche auf den Elektronentransfer wird im Abschnitt 5.2.5 näher betrachtet.

Die Nachbehandlung mit N<sub>2</sub> hat keinen Einfluss auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Reduktion.

Da keine dieser Nachbehandlungen den heterogenen Elektronentransfer vom Material zum Enzym steigern, ist es wahrscheinlich, dass hier der Elektronentransfermechanismus nicht sauerstoffreiche Oberflächengruppen beinhaltet.

### 5.2.5. Porosität: spezifische Oberfläche und Porengröße

Die Zugänglichkeit der Materialoberfläche, an der die HRP adsorbiert wird, spielt möglicherweise eine entscheidende Rolle. Eine große Oberfläche kann die Menge an adsorbiertem Protein steigern und dadurch die Menge an Proteinen, die am Elektronentransfer beteiligt sind. Aber eine große Oberfläche ist oft verbunden mit mehreren kleineren Poren, die für das Enzym unerreichbar und dadurch ineffektiv sind. Tabelle 6 zeigt eine Übersicht der spezifischen Oberflächen und die am häufigsten vorkommenden Porengrößen der untersuchten Materialien. Abbildung 27 zeigt die eigentliche Verteilung der Poren verschiedener Größe für einige der getesteten Materialien.

Material	spezifische Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]	Häufigste Porengröße [Å] *
A	405,50	322,97
B	765,72	305,83
C	439,21	177,71
D	351,82	316,82
E	671,54	170,07
F	592,55	56,37
G	1069,30	94,50
H	652,38	122,77
I	494,53	124,69

Tabelle 6 Spezifische Oberfläche und häufigste Porengröße der untersuchten Materialien ([205]), (\*) Maximum in Abbildung 27.

Nach Immobilisierung von HRP wurde der Reduktionsstrom in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemessen (Abbildung 28). Der höchste Reduktionsstrom wurde mit den Materialien B und F erhalten (11,0 µA/mM und 10,4 µA/mM, Abbildung 28).

Material B hat sowohl eine große spezifische Oberfläche ( $765,72 \text{ m}^2/\text{g}$ ) als auch große Poren ( $305,83 \text{ \AA}$ ) (Tabelle 6). Material G hat die größte spezifische Oberfläche ( $1069,30 \text{ m}^2/\text{g}$ ), allerdings nur sehr kleine Poren ( $94,50 \text{ \AA}$ ). Andererseits haben die Materialien A und D große Poren ( $322,97 \text{ \AA}$  und  $316,82 \text{ \AA}$ ), aber nur eine relativ kleine Oberfläche ( $405,50 \text{ m}^2/\text{g}$  und  $351,82 \text{ m}^2/\text{g}$ ). Dies legt nahe, dass große Oberflächen mit gleichzeitig großen Poren günstig sind, da hier das Enzym leicht an dem Material adsorbieren kann. Material B erfüllt diese Kriterien am besten. Nach Abbildung 27 hat Material A eine ähnliche Porenverteilung wie B, nur mit einer geringeren Anzahl an Poren. Wie erwartet führt dies zu einem geringeren Reduktionsstrom ( $6,8 \text{ \mu A}/\text{mM}$ , Abbildung 28).

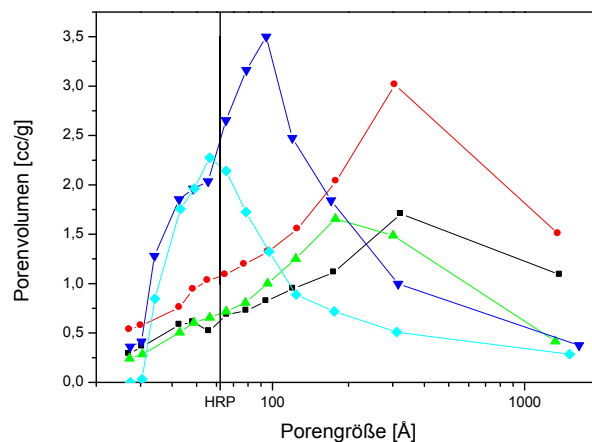


Abbildung 27 Verteilung der Poren einiger der untersuchten Materialien ([205]), (■) Material A, (●) Material B, (▲) Material C, (◆) Material F, (▼) Material G; HRP: Größe der HRP ( $62 \text{ \AA}$ , [31]).

Im Fall des Materials F wurde ein signifikant höheres Reduktionssignal ( $10,4 \text{ \mu A}/\text{mM}$ , Abbildung 28) gemessen, obwohl es nicht den oberen Kriterien für ein geeignetes Material entspricht. Während es noch eine relativ große spezifische Oberfläche ( $592,55 \text{ m}^2/\text{g}$ ) hat, sind die Poren sehr klein ( $56,37 \text{ \AA}$ ). Aber im Vergleich mit der Größe der HRP ( $62 \times 43 \times 12 \text{ \AA}^3$ , [31]) scheint es wahrscheinlich, dass hier viele Poren sind, in denen ein einzelnes Proteinmolekül genau hineinpasst. In diesem Fall wäre das Enzym von dem Material umfasst und die Wahrscheinlichkeit für einen schnellen Elektronentransfer wäre erhöht. Auf diese Weise können mehr Enzymmoleküle an einem schnellen Elektronentransfer beteiligt sein und so den Reduktionsstrom in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  erhöhen.

Material G widerspricht jedoch scheinbar dieser Hypothese. Dieses Material hat etwa die gleiche Anzahl an Poren in die HRP-Moleküle genau hineinpassen (Abbildung 27, mit ‚HRP‘ bezeichnete Porengröße), aber der Reduktionsstrom in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist nur gering

(2,2  $\mu\text{A}/\text{mM}$ , Abbildung 28). Material G hat eine sehr große spezifische Oberfläche (1069,30  $\text{m}^2/\text{g}$ , Tabelle 6), welche wahrscheinlich die Hydrophobizität des Materials erhöht und damit die Zugänglichkeit der Poren für das hydrophile Protein erniedrigt. Dadurch werden nur wenige Enzyme auf diesem Material adsorbiert, was ein niedriges Reduktionssignal erklärt.

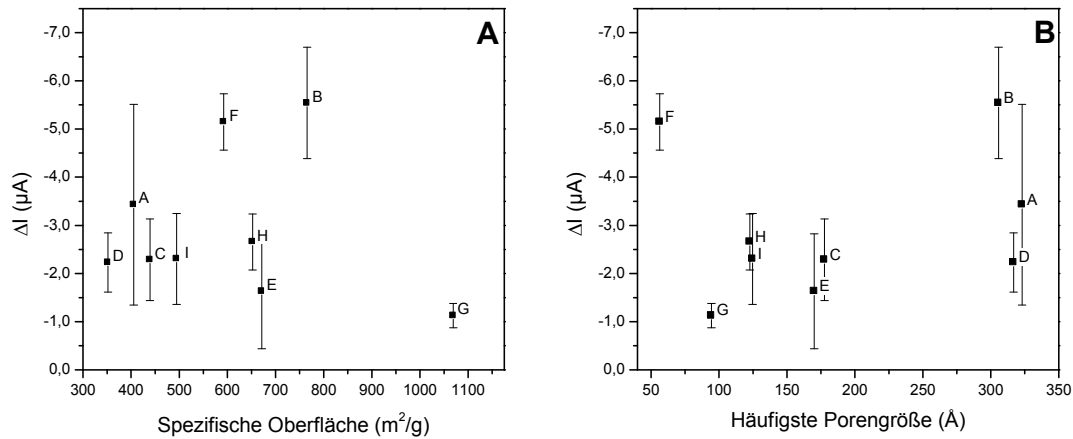


Abbildung 28 Abhängigkeit des Reduktionsstroms für 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  von (A) der spezifischen Oberfläche und (B) der Porengröße (Phosphat Puffer,  $-0,05$  V vs. Ag/AgCl,  $n = 6$ ).

Die spezifische Oberfläche und die Verteilung der Porengröße scheinen also der Haupteinfluss auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Reduktion zu sein. Diese Kriterien können aber auf Grund der hier vorgestellten Untersuchungen nicht als die einzigen Voraussetzungen für eine hohe Aktivität bezeichnet werden. Zu einem gewissen Grad können die gemessenen Signale auch auf unterschiedliche „Oberflächenchemie“ des Kohlenstoffmaterials zurückzuführen sein. Außerdem soll bemerkt werden, dass die verschiedenen Partikel und Porengrößen der Proben zu unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeiten der Reaktanden im Elektrodenkörper führen. Weitere Messungen sind nötig um diese Faktoren zu untersuchen.

### 5.2.6. Kinetische Parameter

Um einen besseren Einblick in den Elektronentransfermechanismus zu erhalten, wurden für einige der untersuchten Materialien die Geschwindigkeitskonstanten ( $k_s$ , Gleichung 12) für den Elektronentransfer bestimmt.

Der gemessene Strom kann entweder durch den Massentransport des Peroxids zum Enzym, die Reduktion des  $\text{H}_2\text{O}_2$  am Enzym oder der Reduktion des HRP-I an der Elektrode – direkt oder über einen Mediator (Abbildung 5, Gleichung 12) – limitiert sein. Die Reduktion von

$\text{H}_2\text{O}_2$  durch das Enzym ist charakterisiert durch die Geschwindigkeitskonstante  $k_1$ . Die Geschwindigkeitskonstante für den heterogenen Elektronentransfer  $k_s$  charakterisiert die Reduktion des HRP-I zum Grundzustand des Enzyms.

Ruzgas *et al.* beschrieben, wie beide Geschwindigkeitskonstanten und die Anzahl der übertragenen Elektronen,  $n$ , mit Hilfe von rotierenden Scheibenelektroden (engl. rotating disk electrodes, RDEs) bestimmt und berechnet werden [207]. Dafür wurden die Reduktionsströme für verschiedene  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen bei verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten gemessen.

Hier wurden ähnliche Experimente mit rotierenden Paste-Elektroden durchgeführt und die Anzahl der übertragenen Elektronen,  $n$ , sowie die Geschwindigkeitskonstante  $k_s$  berechnet. Abbildung 29 zeigt typische hydrodynamische Voltammogramme für eine HRP-modifizierte Elektrode aus Material F, bei denen Rotationsgeschwindigkeit und  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration variiert wurden.

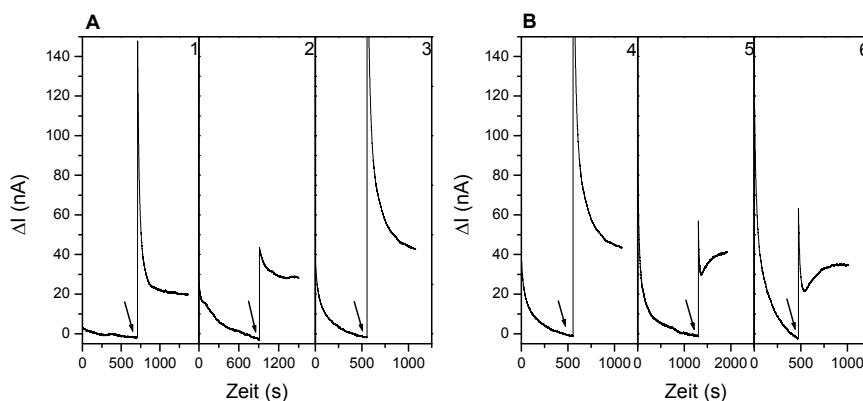


Abbildung 29 Hydrodynamische Voltammogramme für HRP-modifizierte Elektroden aus Material F; (A) Verschiedene  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen bei 1000 U/min, (1) 41  $\mu\text{M}$ , (2) 50  $\mu\text{M}$ , (3) 63  $\mu\text{M}$ , (B) 63  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  mit verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten, (4) 1000 U/min, (5) 690 U/min, (6) 470 U/min; Pfeile zeigen  $\text{H}_2\text{O}_2$  Zugabe.

Nach Ruzgas *et al.* [207] wurde für jede Rotationsgeschwindigkeit der stationäre Strom vor und nach der Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  aufgezeichnet. Die Stromdifferenz wurde gemessen und in einem Koutecky-Levich-Plot aufgezeichnet, um  $n$  und  $k_s$  zu berechnen.

Der Gesamtstrom,  $I$ , setzt sich zusammen aus einem Massentransport-Teil,  $I_{\text{lim}}$ , und einem kinetischen Teil,  $I_{\text{kin}}$  (Gleichung 15).

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{I_{\text{lim}}} + \frac{1}{I_{\text{kin}}} \quad (15)$$



$I_{\text{lim}}$  wird beobachtet, wenn die Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  an der Elektrode sehr viel schneller ist als der Antransport. Nach der Levich-Gleichung (Gleichung 16) [208] hängt dieser Strom bei einer rotierenden Scheibenelektrode von der Winkelgeschwindigkeit,  $\omega$ , und der Konzentration von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der umgebenden Lösung,  $c$  ab.

$$I_{\text{lim}} = 0.620 n F c D^{2/3} A \nu^{-1/6} \omega^{1/2} \quad (16)$$

wobei  $n$  die Anzahl der übertragenen Elektronen,  $F$  die Faraday-Konstante ( $96485,309 \text{ Cmol}^{-1}$ ),  $D$  der Diffusionskoeffizient für  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1,6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ , [207]),  $A$  die Elektrodenfläche ( $7,854 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ ), und  $\nu$  die kinematische Viskosität von Wasser ( $0,01 \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ , [207]) ist.

$I_{\text{kin}}$  hängt ebenfalls von der  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration ab und auch von der Geschwindigkeitskonstante für den Elektronentransfer (Gleichung 17), [35, 207]).

$$\frac{1}{I_{\text{kin}}} = \frac{1}{n F E_{\text{DET}}} \left( \frac{1}{k_1 c} + \frac{1}{k_S} \right) \quad (17)$$

wobei  $E_{\text{DET}}$  die Menge an im DET beteiligtem Enzym (in mol),  $k_1$  die Geschwindigkeitskonstante für die Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  am Enzym und  $k_S$  die Geschwindigkeitskonstante für den Elektronentransfer von der Elektrode zum Enzym (Gleichung 12) ist.

Wird Gleichung 16 in Gleichung 15 eingesetzt, ergibt sich folgende Gleichung 18.

$$I^{-1} = \frac{1}{0.620 n F c D^{2/3} A \nu^{-1/6}} \omega^{-1/2} + \frac{1}{I_{\text{kin}}} \quad (18)$$

Da  $I_{\text{kin}}$  nicht von der Winkelgeschwindigkeit abhängt (Gleichung 17), zeigt Gleichung 18 eine lineare Abhängigkeit von  $I^{-1}$  und  $\omega^{-1/2}$ .

Gleichung	Plot	Steigung	Achsen-Abschnitt	Werte	Beispiele
$I^{-1} = (\text{slope}^{\text{KL}}) \omega^{-1/2} + \frac{1}{I_{\text{kin}}}$	$I^{-1}$ gegen $\omega^{-1/2}$ *	$\frac{1}{0,620 n F c D^{2/3} A \nu^{-1/6}}$	$\frac{1}{I_{\text{kin}}}$	$\text{slope}^{\text{KL}}$ $I_{\text{kin}}^{-1}$	Abb. 30
$\text{slope}^{\text{KL}} = \text{slope}^{\text{S}} c^{-1}$	$\text{slope}^{\text{KL}}$ gegen $c^{-1}$	$\frac{1}{0,620 n F D^{2/3} A \nu^{-1/6}}$	0	$n$	Abb. 31
$\frac{1}{I_{\text{kin}}} = \frac{1}{n F E_{\text{DET}} k_1} c^{-1} + \frac{1}{n F E_{\text{DET}} k_S}$	$I_{\text{kin}}^{-1}$ gegen $c^{-1}$	$\frac{1}{n F E_{\text{DET}} k_1}$	$\frac{1}{n F E_{\text{DET}} k_S}$	$k_S$	Abb. 32

Tabelle 7 Plots und Gleichungen für die Berechnung kinetischer Parameter, (\*) Koutecky-Levich-Plot,  $\text{slope}^{\text{KL}}$  = Steigung des Koutecky-Levich-Plots,  $\text{slope}^{\text{S}}$  = Steigung des Plots von  $\text{slope}^{\text{KL}}$  gegen  $c^{-1}$ .

Wird  $I^{-1}$  gegen  $\omega^{-1/2}$  aufgetragen, erhält man ein Koutecky-Levich-Plot. Sowohl die Steigung als auch der y-Achsenabschnitt des Koutecky-Levich-Plots hängen linear von  $c^{-1}$  ab (Tabelle 7). Wird die Steigung gegen den Kehrwert der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration aufgetragen, kann die Anzahl der übertragenen Elektronen,  $n$ , berechnet werden. Aus einem Plot von  $I_{\text{kin}}^{-1}$  gegen  $c^{-1}$ , kann  $k_s$  nach folgender Gleichung (19) bestimmt werden.

$$k_s = \left( \frac{1}{n F E_{\text{DET}} k_1} / \frac{1}{n F E_{\text{DET}} k_s} \right) k_1 \quad (19)$$

Ein Beispiel eines Koutecky-Levich-Plots (Kehrwert des gemessenen Stroms gegen Kehrwert der Wurzel der Winkelgeschwindigkeit) ist in Abbildung 30 gezeigt. Hiervon wurden die Steigung und der y-Achsenabschnitt aus der linearen Regression bestimmt und jeweils gegen den Kehrwert der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration aufgetragen (Abbildung 31 bzw. Abbildung 32). Aus der Steigung der linearen Regression durch den Ursprung in Abbildung 31 wurde die Anzahl der übertragenen Elektronen,  $n$ , berechnet. Die Werte für die zwei Materialien mit den größten Reduktionsströmen für  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Materialien B und F, und das mit den niedrigsten Strömen, Material G, sind in Tabelle 8 aufgelistet.

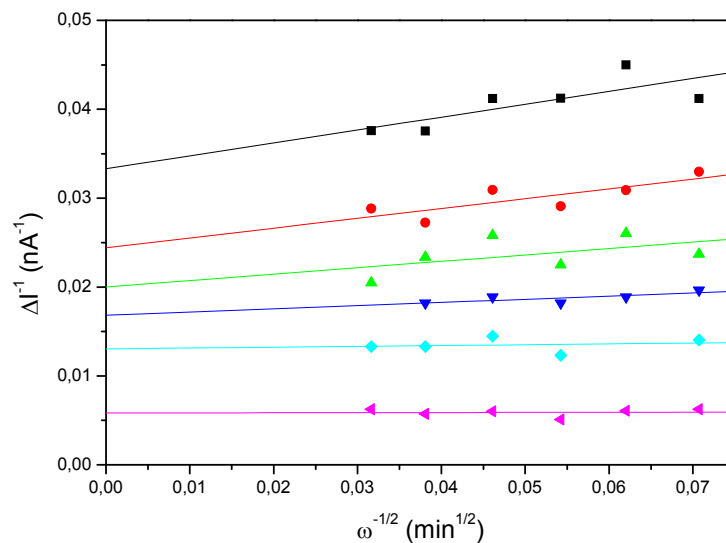


Abbildung 30 Beispiel für ein Koutecky-Levich-Plot (Material F), ■ 41  $\mu\text{M}$ , ● 50  $\mu\text{M}$ , ▲ 63  $\mu\text{M}$ , ▼ 83  $\mu\text{M}$ , ◆ 125  $\mu\text{M}$ , ◆ 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Ruzgas *et al.* bestimmten die Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_s$  durch Schätzung der Menge an aktivem Enzym im DET (siehe Tabelle 7) [35, 207]. Während eine solche Schätzung funktioniert, wenn das Enzym auf einer planaren Oberfläche adsorbiert ist, ist sie bei „porösen“ Paste-Elektroden nicht praktikabel. Ist aber eine der Geschwindigkeitskonstanten bekannt, kann die andere auch ohne  $E_{\text{DET}}$  berechnet werden.

Die Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  beschreibt die Reaktion zwischen Enzym und  $\text{H}_2\text{O}_2$  und sollte unabhängig vom Elektrodenmaterial sein (Abbildung 5).

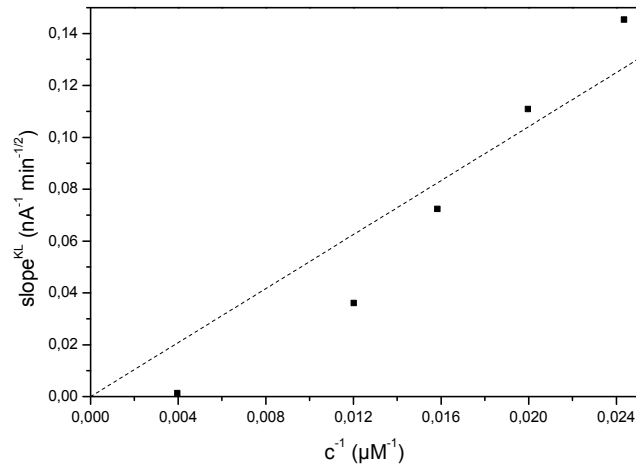


Abbildung 31 Beispiel einer Auftragung der Steigung des Koutecky-Levich-Plots gegen den Kehrwert der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration (Material F).

Laut Gleichung 19 kann die heterogene Elektronentransfer-Geschwindigkeitskonstante,  $k_s$ , aus dem Verhältnis von Steigung und y-Achsenabschnitt der linearen Regression der Auftragung des y-Achsenabschnitts des Koutecky-Levich-Plots,  $I_{\text{kin}}^{-1}$ , gegen den Kehrwert der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration,  $c^{-1}$ , berechnet werden (Abbildung 32).

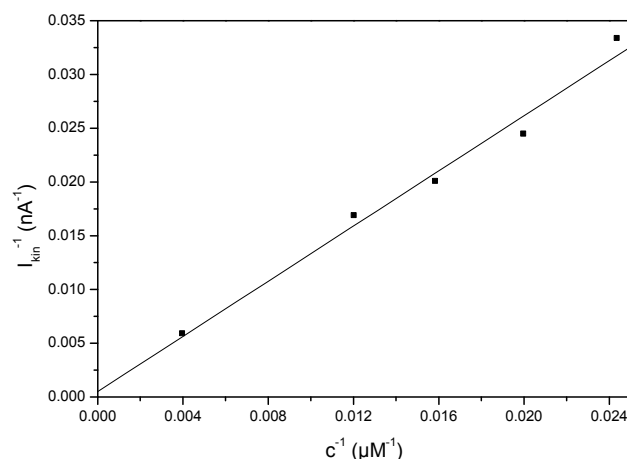


Abbildung 32 Beispiel für eine Auftragung von  $I_{\text{kin}}^{-1}$  gegen den Kehrwert der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration (Material F).

Lindgren *et al.* bestimmten  $k_1$  als  $0,13 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  für HRP [35]. Mit diesem Wert wurde  $k_s$  für einige der verwendeten Materialien bestimmt. Die Werte für die zwei Materialien mit den

größten Reduktionsströmen für  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Materialien B und F, sind in Tabelle 8 aufgelistet. Die Geschwindigkeitskonstante für das Material mit den niedrigsten Reduktionsströmen konnte auf diese Weise nicht bestimmt werden, da hier die Fehler zu groß waren.

Die berechneten Werte  $n$  für die Anzahl der übertragenen Elektronen pro  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist für Elektroden aus den Materialien B und F höher ( $2,7 \pm 0,6$  und  $2,8 \pm 0,4$ ) als der theoretische Wert von 2. Der Wert für Material G ist mit  $0,39 \pm 0,03$  viel zu klein. Die Diskrepanz von Messergebnis und Theorie liegt daran, dass sich bei der rotierenden Paste-Elektrode der Gleichgewichtsstrom nur sehr langsam einstellte (Abbildung 29), wodurch der Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit auf den Reduktionsstrom beeinträchtigt wird. Dies wirkt sich auf Abbildung 31 aus, bei der sich nach Tabelle 7 eine durch den Nullpunkt verlaufende Gerade ergeben müsste. Nach Gleichung 19 wirkt sich diese Ungenauigkeit bei  $n$  aber nicht auf die Berechnung von  $k_S$  aus.

Material	B	F	G
$n$	$2,7 \pm 0,6$	$2,8 \pm 0,4$	$0,39 \pm 0,03$
$k_S [\text{s}^{-1}]$	$3,5 \pm 0,4$	$401 \pm 61$	nicht bestimmbar

Tabelle 8 Kinetische Parameter für ausgewählte Materialien.

Die Elektronentransferrate zwischen Material B und HRP ( $k_S = 3,5 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$ ) ist höher als die Elektronentransferrate an spektroskopischem Graphit ( $k_S = 1,9 \text{ s}^{-1}$ , [35]). Dies bestätigt, dass pyrolysiertes CoTMPP mit einer großen Oberfläche und großen Poren ein besseres Material für den Elektronentransfer mit HRP ist.

Der Elektronentransfer von Material F zu HRP ( $k_S = 401 \pm 61 \text{ s}^{-1}$ ) ist sehr viel schneller als der von Material B. Dies mag an der Porengröße liegen, die in der Größenordnung des Enzymmoleküls liegt. Daher könnte es im engen Kontakt mit der Elektrode stehen wodurch ein schneller Elektronentransfer ermöglicht wäre. Weiterhin werden wahrscheinlich redoxaktive Metallkomplexe während des Pyrolyseprozesses gebildet, die ebenfalls den Elektronentransfer erleichtern. Bisher wurden solch hohe Werte für  $k_S$  nur für rekombinante HRP beobachtet ( $k_S = 451,6 \text{ s}^{-1}$  oder  $k_S = 434 \text{ s}^{-1}$ , pH 6,0, [101, 209]).

### 5.3. Teil C: Osmium substituierte Meerrettich Peroxidase

Die Spezifität eines Biosensors wird vor allem vom biologischen Erkennungselement bestimmt, bei den in dieser Arbeit untersuchten Sensoren also von der Meerrettich Peroxidase. Die Spezifität eines Enzyms wiederum wird von den funktionellen Gruppen im aktiven Zentrum und der Flexibilität des Proteingerüsts bestimmt.

Bei der HRP besteht das aktive Zentrum aus einem Eisen-Protoporphyrin IX und den umgebenden Aminosäureresten (R38, H42 und H170) [32]. Eine entscheidende Rolle spielt dabei das Eisen. Um seine Rolle besser zu verstehen, wurde es durch eine Reihe von Metallen, zumeist aus derselben Periode (z.B. Mn, Ni, Co etc.), ersetzt und das resultierende Enzym-Derivat untersucht [124-132, 166, 167].

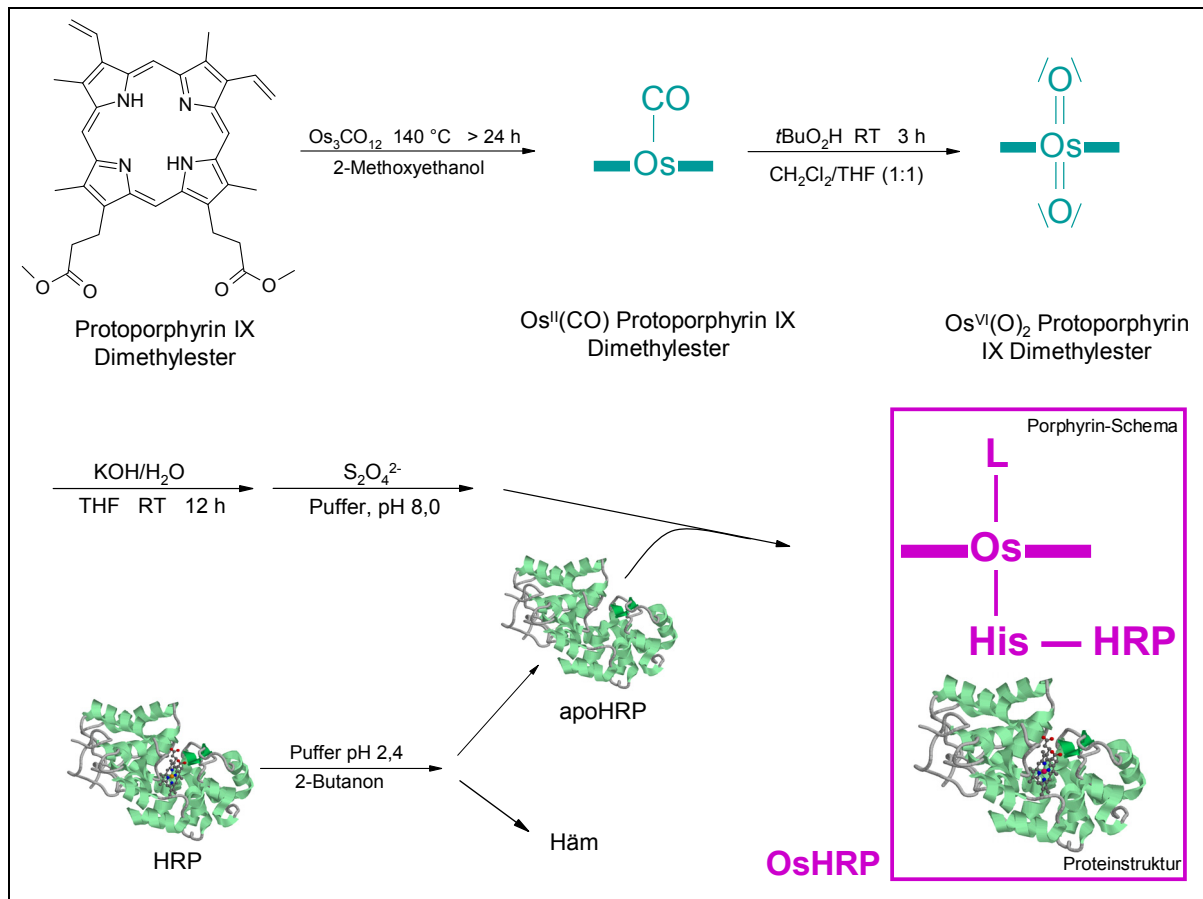


Abbildung 33 Übersicht über die OsHRP-Darstellung.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Eisenion in der HRP erstmals durch ein schwereres Homolog, das Osmiumion, ersetzt. Dazu wurde zunächst Os-Protoporphyrin IX hergestellt. Das Fe-Protoporphyrin IX der HRP wurde aus dem nativen Enzym (FeHRP) herausgelöst. Anschließend wurde Os-Protoporphyrin IX in die apoHRP eingebaut (Abbildung 33).

### 5.3.1. Osmium-Protoporphyrin IX

#### 5.3.1.1. $\text{Os}^{\text{II}}(\text{CO})$ -Protoporphyrin IX-Dimethylester

Die Darstellung des Os-Protoporphyrin IXs erfolgte nach Che *et al.* [187] (Abbildung 13). Die Ausbeute war mit ca. 30 % weniger als halb so groß wie in der Literatur beschrieben (70 %), allerdings verwendeten Che *et al.* das Mesoporphyrin und nicht das Protoporphyrin [187].

Im Massenspektrum von Os-Protoporphyrin IX-Dimethylester wurde eine Peakgruppe um  $m/z = 1567$  gefunden. Diese Peakgruppe kann einem Os-Protoporphyrin IX-Dimethylester-Dimer ohne Carbonyl-Gruppen ( $M_w = 1562$  g/mol, Abbildung 34) zugeordnet werden. Die Dimerbildung erfolgt dabei im Massenspektrometer während der Laserdesorption oder des anschließenden Ionenflugs.

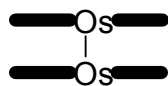


Abbildung 34 Schema eines Os-Protoporphyrin IX-Dimethylester-Dimers.

Im IR-Spektrum ist bei  $1887\text{ cm}^{-1}$  eine deutliche Carbonyl-Bande sichtbar. Dies bestätigt, dass mindestens eine der zwei freien Koordinationsstellen des Osmiums, wie in der Literatur [187, 189] beschrieben, von einem CO-Liganden aus der Osmium-Quelle ( $\text{Os}_3\text{CO}_{12}$ ) besetzt ist.

Im UV-VIS-Spektrum ist eine Soret-Bande bei 389 nm zu sehen (Abbildung 35, 1). Die Q-Banden liegen bei 503 nm (mit 3,7 % der Absorptionsstärke der Soret-Bande, 2) und bei 537 nm (mit 6,1 % der Absorptionsstärke der Soret-Bande, 3).

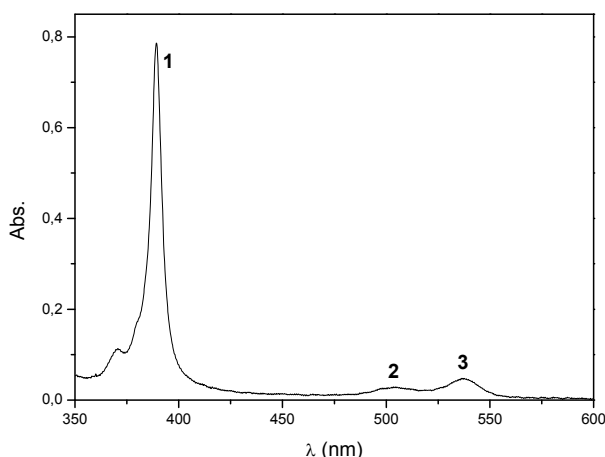


Abbildung 35 UV-VIS-Spektrum von  $\text{Os}^{\text{II}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})$  (in DCM/THF, 1:1), (1) 389 nm, (2) 503 nm, (3) 537 nm.

## 5.3.1.2. Elektrochemie in organischen Lösungsmitteln

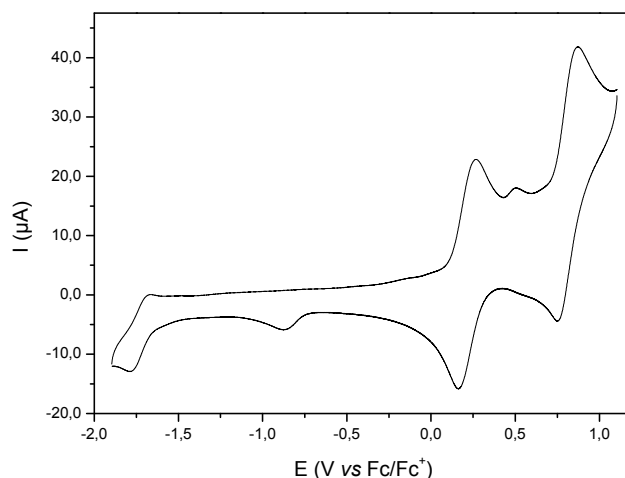


Abbildung 36 CV von  $\text{Os}^{\text{II}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})$  in DCM, Leitsalz 100 mM  $\text{NBu}_4\text{PF}_6$ , 100 mV/s, GC-Elektrode, Referenzsystem Ferrocen/Ferrocenium (hier nicht zugegeben).

Im zyklischen Voltammogramm (CV) des  $\text{Os}^{\text{II}}(\text{CO})$ -Protoporphyrin IXs ( $\text{Os}^{\text{II}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})$ ) sind drei Redoxpaare zu erkennen. Die Halbstufenpotentiale dieser Redoxpaare liegen bei -1,74 V, 0,21 V und 0,82 V (gegen Ferrocen/Ferrocenium,  $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ ). Weiterhin sind ein zusätzlicher Reduktionspeak bei -0,87 V ( $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ ) zu sehen.

	$E_{1/2}$ (V)
$[\text{Os}^{\text{II}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})]^- + e^- \rightarrow [\text{Os}^{\text{II}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})]^{2-}$	-1,74
$[\text{Os}^{\text{II}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})] + e^- \rightarrow [\text{Os}^{\text{II}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})]^-$	-0,87 (red)
$[\text{Os}^{\text{III}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})] + e^- \rightarrow [\text{Os}^{\text{II}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})]$	0,21
$[\text{Os}^{\text{IV}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})] + e^- \rightarrow [\text{Os}^{\text{III}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})]$	0,82

Tabelle 9 Redoxpotentiale von  $\text{Os}^{\text{II}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})$  in DCM, GC-Elektrode, Potentiale gegen  $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ .

Ein dem bei -1,74 V entsprechendes Redoxpaar und ein dem bei -0,87 V entsprechender Reduktionspeak werden auch beim metallfreien Protoporphyrin IX-Dimethylester gemessen (-1,72 V und -0,79 V). Diese beiden Potentiale sind also auf Reduktionsvorgänge am Ring zurückzuführen. Das Redoxpaar bei -1,74 V ist weiterhin vergleichbar mit dem Literaturwert der 2. Ringreduktion des  $\text{Os}(\text{TPP})(\text{CO})$  (TPP = Tetraphenylporphyrin), (umgerechnet auf  $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ : -1,51 V, Tabelle 10, [210]), wobei der Potentialunterschied zwischen Ferrocen/Ferrocenium ( $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ ) und der Standard-Kalomel-Elektrode (SCE) 0,34 V beträgt [2]. Dem Reduktionspeak bei -0,87 V kommt die 1. Ringreduktion, beim  $\text{Os}(\text{TPP})(\text{CO})$  -1,06 V (umgerechnet auf  $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ ), am nächsten (Tabelle 10, [210]).

Die anderen Redoxpotentiale des Os<sup>II</sup>(PIX-DME)(CO) sind beim metallfreien PIX-DME nicht zu finden und sind daher auf Redoxvorgänge am Osmium zurückzuführen. Die erste Oxidation bei 0,21 V kann der ersten Oxidation des Os<sup>II</sup> zum Os<sup>III</sup> zugeordnet werden, die zweite Oxidation bei 0,82 V der des Os<sup>III</sup> zum Os<sup>IV</sup>. Die Redoxpotentiale des Os<sup>II</sup>(PIX-DME)(CO) sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Um die Zuordnung dieser Potentiale zu bestätigen, wurden sie mit Literaturwerten anderer Os-Porphyrine verglichen. In Tabelle 10 sind Literaturwerte für ähnliche Os-Porphyrine aufgelistet.

	E (V)						Literatur
	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>	E <sub>4</sub>	E <sub>5</sub>	E <sub>6</sub>	
Os(TPP)(CO)	-1,17 <sup>a</sup>	-0,72 <sup>a</sup>	0,51 <sup>a</sup>	1,31 <sup>a</sup>			[210]
Os(OEP)(CO)			0,36 <sup>a</sup>	0,90 <sup>a</sup>			[210]
Os(OEP)(1-Meim) <sub>2</sub>			-0,63 <sup>a</sup>	0,61 <sup>a</sup>		1,5 <sup>a</sup>	[183, 184]
Os(TPP)(OEt) <sub>2</sub>				-1,14 <sup>b</sup>	0,31 <sup>b</sup>		[192, 211]
Os(OEP)(OEt) <sub>2</sub>				-1,37 <sup>b</sup>	0,13 <sup>b</sup>	1,06 <sup>b</sup>	[192]
Os(MIX-DME)(OEt) <sub>2</sub>				-1,34 <sup>b</sup>	0,15 <sup>b</sup>	1,04 <sup>b</sup>	[192]

Tabelle 10 Redoxpotentiale verschiedener Os-Porphyrine in der Literatur, <sup>a</sup> gegen SCE, <sup>b</sup> gegen Fc/Fc<sup>+</sup>, Potentialunterschied zwischen Fc/Fc<sup>+</sup> und SCE: 0,34 V [2], E<sub>1</sub>: 2. Ringreduktion, E<sub>2</sub>: 1. Ringreduktion, E<sub>3</sub>: Os<sup>II</sup>/Os<sup>III</sup>, E<sub>4</sub>: Os<sup>III</sup>/Os<sup>IV</sup>, E<sub>5</sub>: Os<sup>IV</sup>/Os<sup>V</sup>, E<sub>6</sub>: Ringoxidation.

Os-Mesoporphyrin IX (Os(MIX)), welches sich vom Os-Protoporphyrin IX (Os(PIX)) nur durch zwei periphere Ethyl- (beim Os(MIX)) anstelle von Vinyl- (beim Os(PIX)) Gruppen unterscheidet, hat ähnliche Redoxpotentiale wie das Os-Octaethylporphyrin (Os(OEP)), während die auf das Osmium zurückzuführende Redoxpotentiale des Os-Tetraphenylporphyrins (Os(TPP)) etwa 0,2 V positiver sind.

Axiale Liganden können einen sehr großen Einfluss auf die Redoxchemie des Os-Porphyrins haben. Die dem Osmium zugeordneten Redoxpotentiale bei einem axialen (CO)-Liganden sind etwa 2 V positiver als bei zwei Ethoxy (OEt)-Liganden und etwa 0,3 V positiver als bei zwei Methylimidazol (1-Meim)-Liganden. G. M. Brown *et al.* zeigten, dass das Redoxpotential des Me<sup>II</sup>(Porphyrin)<sub>2</sub>/Me<sup>III</sup>(Porphyrin)<sub>2</sub>-Übergangs um etwa 0,8 V bei Me = Fe und mehr als etwa 0,6 V bei Me = Ru ansteigt, wenn ein N-Ligand (Pyridin, Imidazol) durch CO ausgetauscht wird [188]. Als Grund für diese Potentialdifferenz nennen sie die stabilisierende Wirkung des CO-Liganden durch den Rückbindungseffekt. Dabei wird neben der  $\sigma$ -Bindung auch eine  $\pi$ -Bindung zwischen d-Orbitalen des Metalls und den anti-bindenden  $\pi$ -Orbitalen des Carbonyls ausgebildet, wodurch die Valenz-d-Level stabilisiert werden [188].

Ausgehend von den in Tabelle 10 zusammengefassten Literaturwerten und unter Berücksichtigung der Potentialunterschiede durch verschiedene axiale Liganden und



Porphyrine sollte das Redoxpotential für den Os<sup>II</sup>/Os<sup>III</sup>-Übergang des Os(PIX-DME)(CO) um 0 V, für den Os<sup>III</sup>/Os<sup>IV</sup>-Übergang um 0,6 V und für den Os<sup>IV</sup>/Os<sup>V</sup>-Übergang um 2,1 V liegen. Die gemessenen Redoxpotentiale (Tabelle 9) des Os(PIX-DME)(CO) sind demnach etwa 0,2 V positiver als die von der Literatur abgeleiteten Werte.

### 5.3.1.3. Elektrochemie in wässrigen Medien

Die in der Literatur beschriebenen elektrochemischen Messungen von Os-Porphyrinen wurden in organischen Medien durchgeführt [183, 210, 211]. Da aber die OsHRP in wässrigen Medien untersucht werden sollte, wurden hier elektrochemische Messungen von Os-Porphyrin in Puffer durchgeführt. Zuvor wurde der Dimethylester verseift, um eine bessere Löslichkeit in wässrigen Medien zu erhalten.

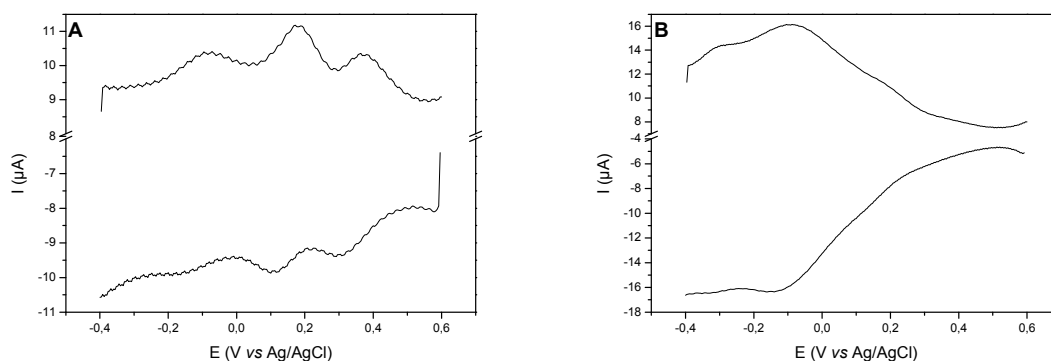


Abbildung 37 SWV von Os<sup>II</sup>(PIX)(CO) adsorbiert auf einer (A) PG- bzw. (B) GC-Elektrode, 60 Hz, Phosphat-Puffer, pH 6,0.

Das Os-Porphyrin wurde als freie Säure auf Kohlenstoff-Elektroden adsorbiert. Im Square-Wave-Voltammogramm (SWV) sind bei einer Adsorption auf einer PG-Elektrode (PG = pyrolytisches Graphit) drei Redoxpaare bei E<sub>1/2</sub> = -0,19 V, +0,12 V und +0,32 V (Ag/AgCl), bei Adsorption auf einer GC-Elektrode (GC = Glaskohlenstoff, engl. gassy carbon) ein Redoxsignal bei E<sub>1/2</sub> = -0,11 V zu sehen (Abbildung 37, Tabelle 11).

	E <sub>1/2</sub> (V) (PG)	E <sub>1/2</sub> (V) (GC)
[Os <sup>III</sup> (PIX)(CO)] + e <sup>-</sup> → [Os <sup>II</sup> (PIX)(CO)]	-0,19	-0,11
[Os <sup>IV</sup> (PIX)(CO)] + e <sup>-</sup> → [Os <sup>III</sup> (PIX)(CO)]	0,12	
[Os <sup>V</sup> (PIX)(CO)] + e <sup>-</sup> → [Os <sup>IV</sup> (PIX)(CO)]	0,32	

Tabelle 11 Redoxpotentiale von auf Kohlenstoff-Elektroden (PG bzw. GC) adsorbiertem Os<sup>II</sup>(PIX)(CO) in Phosphat-Puffer, pH 6,0, Potentiale gegen Ag/AgCl.

Diese Redoxpaare haben relativ niedrige Potentiale und sind auf Redoxvorgänge am Zentralatom zurückzuführen, da Redoxvorgänge am Ring nur bei höheren Potentialen stattfinden. Da Os<sup>II</sup>(PIX)(CO) immobilisiert wurde, wird dem Redoxpaar mit dem kleinsten Potential, -0,19 V (PG) bzw. -0,11 V (GC), der Os<sup>II</sup>/Os<sup>III</sup>-Übergang zugeschrieben. Unter Berücksichtigung der Differenz zwischen Ag/AgCl und Fc/Fc<sup>+</sup>, ist dieses Potential etwa 0,7 bis 0,8 V kleiner als das Redoxpotential des Os<sup>II</sup>/Os<sup>III</sup>-Übergangs im organischen Medium (0,21 V vs. Fc/Fc<sup>+</sup>). Diese Potentialdifferenz kann dadurch erklärt werden, dass bei der Adsorption die Porphyrine „gestapelt“ werden und dabei aggregieren. So können z.B. zwei Os(PIX)(CO), die mit der CO-freien Seite zueinander liegen, Dimere bilden. Der CO-Ligand eines Os(PIX)(CO) kann ein benachbartes Porphyrin beeinflussen. Diese und andere Aggregationseffekte bewirken anscheinend, dass das Osmium des Os<sup>II</sup>(PIX)(CO) leichter oxidierbar ist als in DCM-Lösung.

Das nächste Redoxsignal bei 0,12 V wird dem Os<sup>III</sup>/Os<sup>IV</sup>-Übergang und das bei 0,32 V dem Os<sup>IV</sup>/Os<sup>V</sup>-Übergang zugeschrieben.

Zum Vergleich wurde auch das Häm der nativen HRP, das Hämin (Fe-Protoporphyrin IX) auf gleiche Weise adsorbiert. Auf einer PG-Elektrode zeigt Hämin kaum eine elektrochemische Aktivität. Wird Hämin auf einer GC-Elektrode adsorbiert, ist ein Redoxpaar mit  $E_{1/2} = -0,35$  V (Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup>) zu sehen.

Das Os-Porphyrin lässt sich also leichter als das Fe-Porphyrin reduzieren. Außerdem sind mehr Oxidationsstufen messbar. Behält es diese Eigenschaft auch beim Einbau in das Enzym, kann es sich günstig auf die Elektrochemie der OsHRP auswirken.

### 5.3.2. Axialer CO-Ligand des Os-Porphyrins

Der axiale CO-Ligand koordiniert stark am Os<sup>II</sup> und dissoziiert, anders als beim Fe<sup>II</sup>, auch nach Oxidation zum Os<sup>III</sup> und Os<sup>IV</sup> nicht. Wurde apoHRP mit Os<sup>II</sup>(PIX)(CO) rekonstituiert, so konnte keine Aktivität der entstandenen OsHRP festgestellt werden. Ein möglicher Grund dafür ist, dass der CO-Ligand das aktive Zentrum blockiert und das Substrat nicht an das Porphyrin heran kommt.

Daher wurde der CO-Ligand des Os-Porphyrins vor Verseifung und Einbau in das Protein chemisch entfernt.

#### 5.3.2.1. Entfernung des CO-Liganden

Der axiale CO-Ligand kann nur durch Oxidation des Osmiums auf Os<sup>VI</sup> entfernt werden, was elektrochemisch nicht erreicht wurde. Nach der Oxidation durch *t*BuO<sub>2</sub>H nach Buchler [189] zeigt das Massenspektrum wieder eine Peakgruppe um  $m/z = 1567$ . Es bildet sich also auch hier ein Dimer. Außerdem ist auch eine Peakgruppe um  $m/z = 782$  zu sehen, welche einem Os-Protoporphyrin IX-Dimethylester-Monomer ( $M_w = 781$  g/mol) zugeordnet werden kann.

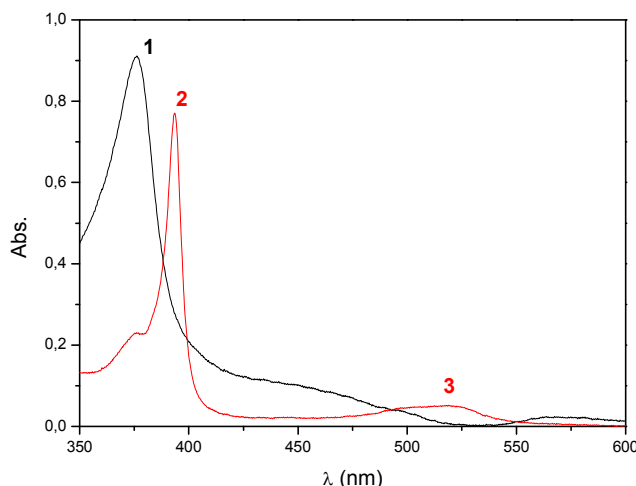


Abbildung 38 UV-VIS-Spektrum von (—)  $\text{Os}^{\text{VI}}(\text{PiX-DME})(\text{O})_2$  und (—)  $\text{Os}^{\text{III}}(\text{PiX-DME})(\text{DCM})_2$ , in DCM (1:1), (1) 376 nm, (2) 394 nm, (3) 519 nm.

Die CO-Bande im IR-Spektrum bei  $1887\text{ cm}^{-1}$  ist vernachlässigbar klein, was die Entfernung des CO-Liganden bestätigt.

Die Soret-Bande verschiebt sich hypsochrom von 389 nm um 13 nm auf 376 nm (Abbildung 38). Durch Reduktion zum  $\text{Os}^{\text{III}}$ -Porphyrin wird die Soret-Bande um 18 nm auf 394 nm zurückverschoben (Abbildung 38). Allerdings ist nach einiger Zeit in Lösung das UV-VIS-Spektrum des  $\text{Os}^{\text{III}}(\text{PiX-DME})(\text{DCM})_2$  identisch mit dem des  $\text{Os}^{\text{VI}}(\text{PiX-DME})(\text{O})_2$ . Das  $\text{Os}^{\text{III}}$ -Porphyrin ist also ohne stabilisierende Liganden in Lösung nicht stabil und wird durch Luftsauerstoff zu  $\text{Os}^{\text{VI}}$  oxidiert.

### 5.3.2.2. Elektrochemie des CO-freien Os-Porphyrins

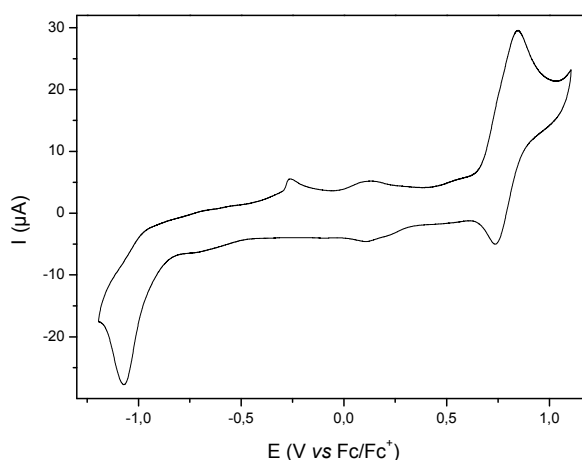


Abbildung 39 CV von  $\text{Os}^{\text{VI}}(\text{PiX-DME})(\text{O})_2$  in DCM, Leitsalz 50 mM  $\text{NBu}_4\text{BF}_4$ , 100 mV/s, GC-Elektrode, Referenzsystem Ferrocen/Ferrocenium (hier nicht zugegeben).

Im CV des  $\text{Os}^{\text{VI}}(\text{PIX-DME})(\text{O})_2$  sind drei Redoxpaare mit Halbstufenpotentialen bei -1,01 V, 0,12 V und 0,79 V ( $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ ) zu erkennen. Das höchste Redoxpotential (0,79 V) liegt niedriger als die in der Literatur angegebenen Potentiale für die Ringoxidation (Tabelle 10) und ist daher auf einen Redoxvorgang am Osmium zurückzuführen. Da das Osmium Redoxzustände zwischen (II) und (VI) einnehmen kann und für die Messung  $\text{Os}^{\text{VI}}$  eingesetzt wurde, ist dieses Redoxpotential dem  $\text{Os}^{\text{V}}/\text{Os}^{\text{VI}}$ -Übergang zuzuordnen (Tabelle 12). Das nächste Redoxpotential bei 0,12 V ist auf den  $\text{Os}^{\text{IV}}/\text{Os}^{\text{V}}$ -Übergang zurückzuführen und ist demnach dem  $\text{Os}^{\text{IV}}/\text{Os}^{\text{V}}$ -Übergang des  $\text{Os}(\text{OEP})(\text{OEt})_2$  und des  $\text{Os}(\text{MIX-DME})(\text{OEt})_2$  ähnlich (Tabelle 10). Das dritte Redoxpotential des  $\text{Os}^{\text{VI}}(\text{PIX-DME})(\text{O})_2$  (-1,01 V) ist zwar negativer als das Potential der 1. Ringreduktion beim  $\text{Os}^{\text{II}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})$  (-0,87 V, Tabelle 9), aber etwa 0,3 V positiver als das Potential des  $\text{Os}^{\text{III}}/\text{Os}^{\text{IV}}$ -Übergang des  $\text{Os}(\text{OEP})(\text{OEt})_2$  bzw.  $\text{Os}(\text{MIX-DME})(\text{OEt})_2$  (Tabelle 10). Da das Redoxpotential des  $\text{Os}^{\text{IV}}/\text{Os}^{\text{V}}$ -Übergangs dem des  $\text{Os}(\text{OEP})(\text{OEt})_2$  und des  $\text{Os}(\text{MIX-DME})(\text{OEt})_2$  ähnlich ist, ist das Redoxpotential bei -1,01 V dem  $\text{Os}^{\text{III}}/\text{Os}^{\text{IV}}$ -Übergang zuzuordnen. Die Redoxpotentiale des  $\text{Os}^{\text{VI}}(\text{PIX-DME})(\text{O})_2$  sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

	$E_{1/2}$ (V)
$[\text{Os}^{\text{IV}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})] + e^- \rightarrow [\text{Os}^{\text{III}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})]$	-1,01
$[\text{Os}^{\text{V}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})] + e^- \rightarrow [\text{Os}^{\text{IV}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})]$	0,12
$[\text{Os}^{\text{VI}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})] + e^- \rightarrow [\text{Os}^{\text{V}}(\text{PIX-DME})(\text{CO})]$	0,79

Tabelle 12 Redoxpotentiale von  $\text{Os}^{\text{VI}}(\text{PIX-DME})(\text{O})_2$  in DCM, GC-Elektrode, Potential gegen  $\text{Fc}/\text{Fc}^+$ .

### 5.3.3. Darstellung und erste Untersuchungen der OsHRP

Vor dem Einbau in das Protein wurde das  $\text{Os}^{\text{VI}}(\text{PIX-DME})(\text{O})_2$  verseift. Nach der Verseifung des Dimethylesters ist im Massenspektrum eine Peakgruppe bei  $m/z = 756$  zu finden, welche der freien Säure zugeordnet werden kann ( $M_w = 753$  g/mol).

Beim Einbau in das Protein verschiebt sich die Soret-Bande des Os-Porphyrins wie beim Fe-Porphyrin um 5 nm. Das  $\text{Os}^{\text{III}}$ -Porphyrin hat im wässrigen Medium eine Soret-Bande bei 390 nm. Die Soret-Bande der  $\text{Os}^{\text{III}}$ HRP liegt bei 395 nm (Abbildung 40, Tabelle 13). Allerdings liegt ein Teil der OsHRP in einem anderen Redoxzustand vor. Die zweite Soret-Bande bei 377 nm legt nahe, dass auch  $\text{Os}^{\text{VI}}$ HRP in der Probe vorhanden ist.

Das in Abbildung 40 mit „OsPor“ bezeichnete Spektrum ist das vom  $\text{Os}^{\text{III}}$ -Porphyrin, allerdings ist die vermessene Probe die bei der Aufreinigung der OsHRP erhaltene Fraktion mit nicht eingebautem Porphyrin, enthält also möglicherweise auch geringfügige Proteinreste. Die eventuellen Verunreinigungen wirken sich aber scheinbar nicht auf das UV-VIS

Spektrum im gezeigten Bereich aus. Os<sup>VI</sup>-Porphyrin (Soret-Bande bei 373 nm) ist ebenfalls in der Probe vorhanden.

Die apoHRP ist porphyrinfrei und hat somit keine Soret-Bande (Abbildung 40).

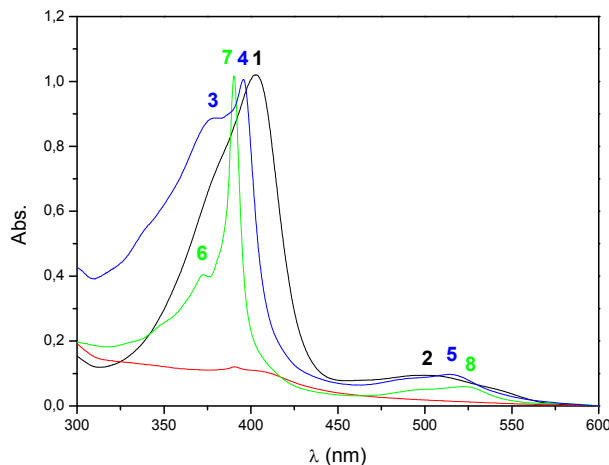


Abbildung 40 UV-VIS Spektren von (—) FeHRP (1) 403 nm (2) 499 nm, (—) OsHRP (3) 377 nm (4) 395 nm (5) 516 nm, (—) apoHRP und (—) „OsPor“ (6) 373 nm (7) 390 nm (8) 523 nm (Phosphat-Puffer, pH 7,0).

Auch die CO-freie OsHRP zeigt im Aktivitätstest mit TMB keine Aktivität (Tabelle 13). Dies kann entweder daran liegen, dass OsHRP nicht aktiv ist, oder daran dass TMB kein geeignetes Reduktionsmittel ist.

Mit ABTS, Ferrocyanid, Hydrochinon und Ascorbinsäure, alles gängige Substrate der FeHRP, konnte ebenfalls kein Substratumsatz durch OsHRP gemessen werden.

Da keine Aktivität der OsHRP gefunden werden konnte, wurde die OsHRP in Gegenwart von Peroxid mittels UV-VIS-Spektrometrie untersucht.

Probe	Aktivität (U/mg)	Soret-Bande (nm)
OsHRP	0,427	395 (Os <sup>III</sup> ), 377 (Os <sup>VI</sup> )
FeHRP	6927	403
„OsPor“	—	390 (Os <sup>III</sup> ), 373 (Os <sup>VI</sup> )

Tabelle 13 Aktivitäten und Soret-Banden.

Die Bildung von FeHRP-I bei Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu FeHRP wird im UV-VIS Spektrum durch eine bathochrome Verschiebung der Soret-Bande um 14 nm sichtbar (Abbildung 41A).

Bei Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu „OsPor“ und OsHRP wird die Soret-Bande ebenfalls verschoben, allerdings hypsochrom (Abbildung 41B und C). Um zu Bestimmen ob diese Verschiebung

durch Reaktion mit Peroxid verursacht wird, wurde die Abhängigkeit der Änderung von der Zeit und der Peroxidkonzentration untersucht.

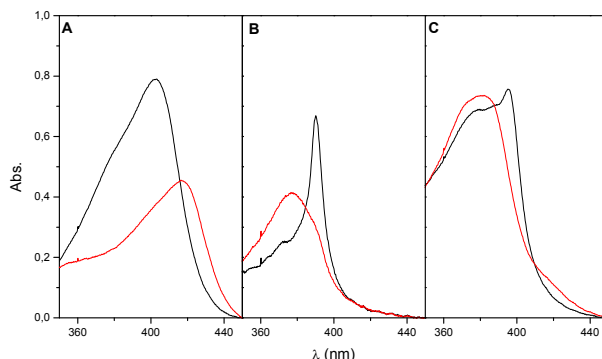


Abbildung 41 Einfluss von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die Lage der Soret-Bande: (—) ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$ , (—) mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ , (A) FeHRP (403 nm, 417 nm), (B) „OsPor“ (390 nm, 377 nm), (C) OsHRP (395 nm, 380 nm).

#### 5.3.4. Kinetische Untersuchung der OsHRP

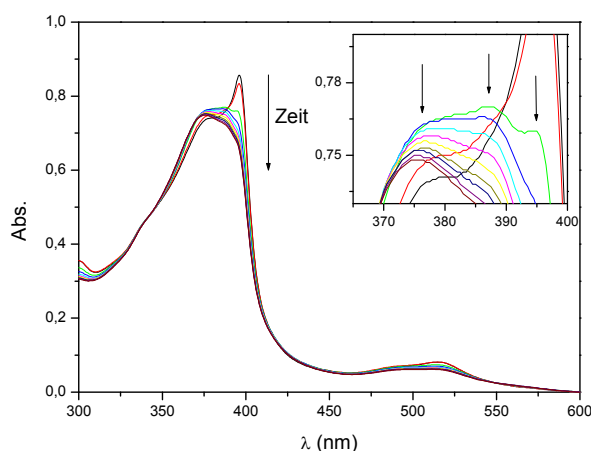


Abbildung 42 UV-VIS-Spektren von OsHRP in Gegenwart von 1 mM  $t\text{BuO}_2\text{H}$ ,  $\Delta t = 10$  min zwischen zwei aufeinander folgenden Spektren; Einschub: drei Absorptionsmaxima der OsHRP.

In der Literatur wurden kinetische Messungen der Reaktion von MnHRP mit Peroxiden in Abwesenheit eines zweiten Substrats beschrieben [124, 125]. Dabei wurde die Absorptionzunahme bei 412,5 nm, der Soret-Bande der oxidierten MnHRP, beobachtet. Die Reaktion ist bei Peroxid-Überschuss (mehr als das 10 fache der MnHRP-Konzentration) pseudo-erster Ordnung. Die Absorption in Abhängigkeit von der Zeit wird dabei von einer einfach-exponentiellen Funktion beschrieben und  $k_{\text{obs}}$ , der negative Exponentialkoeffizient

der Funktion bzw. die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Reaktion, hängt dann linear von der Peroxid-Konzentration ab.

Die Absorptionsabnahme bei 395 nm, die Soret-Bande der reduzierten OsHRP, in Gegenwart von Peroxiden ist deutlicher zu sehen als die Zunahme der Absorption des oxidierten Enzyms (Abbildung 42). Bei genauerer Betrachtung scheint die Reaktion über ein Zwischenprodukt mit einer Soret-Bande von 386 nm zu verlaufen (Abbildung 42, Einschub).

Die Soret-Banden der drei Zustände sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Die OsHRP mit Soret-Bande bei 395 nm wurde bereits als Os<sup>III</sup>HRP und die mit einer Soret-Bande bei 377 nm als Os<sup>VI</sup>HRP identifiziert. Das Zwischenprodukt wird im Folgenden als [OsHRP]<sub>Z</sub> bezeichnet.

Soret-Bande	
Os <sup>III</sup> HRP	395 nm
[OsHRP] <sub>Z</sub>	386 nm
Os <sup>VI</sup> HRP	377 nm

Tabelle 14 Soret-Banden der drei OsHRP-Formen

Die Reaktion der OsHRP kann also vorläufig nach folgenden Schema (20) beschrieben werden.



Reagiert eine Form der OsHRP mit Peroxid, so ist die Reaktionsgeschwindigkeit abhängig von der Enzym- und der Peroxid-Konzentration. Die Reaktion ist in diesem Fall also zweiter Ordnung oder, bei Peroxid-Überschuss, pseudo-erster Ordnung. Ist die Reaktionsgeschwindigkeit unabhängig von der Peroxid-Konzentration, so ist sie erster Ordnung und die OsHRP-Form reagiert nicht mit Peroxid.

Die Absorptionsänderung ist bei der OsHRP sehr viel langsamer (mehrere min) als bei der Reaktion von MnHRP mit Peroxiden (ms bis s). Ein weiterer Unterschied ist, dass die Absorptionsänderung in Abhängigkeit von der Zeit nicht von einer einfach-exponentiellen (Abbildung 43A), sondern von einer doppelt-exponentiellen Funktion (Abbildung 43B) beschrieben wird. Dies bestätigt die Annahme von zwei aufeinander folgenden Reaktionen, wobei sich die Absorption bei 395 nm aus der Absorption der Os<sup>III</sup>HRP und der Absorption der Zwischenform [OsHRP]<sub>Z</sub> zusammensetzt.

Bei einer Reaktion pseudo-1. Ordnung ändert sich die Konzentration des limitierenden Edukts (A) exponentiell mit der Zeit (Tabelle 15), ähnlich bei einer Reaktion 1. Ordnung. Der Unterschied besteht lediglich darin, dass die beobachtete Geschwindigkeitskonstante bei einer Reaktion 1. Ordnung gleich der eigentlichen Geschwindigkeitskonstante ist, bei einer Reaktion pseudo-1. Ordnung jedoch linear von der Konzentration des im Überschuss vorhandenen Edukts abhängt.

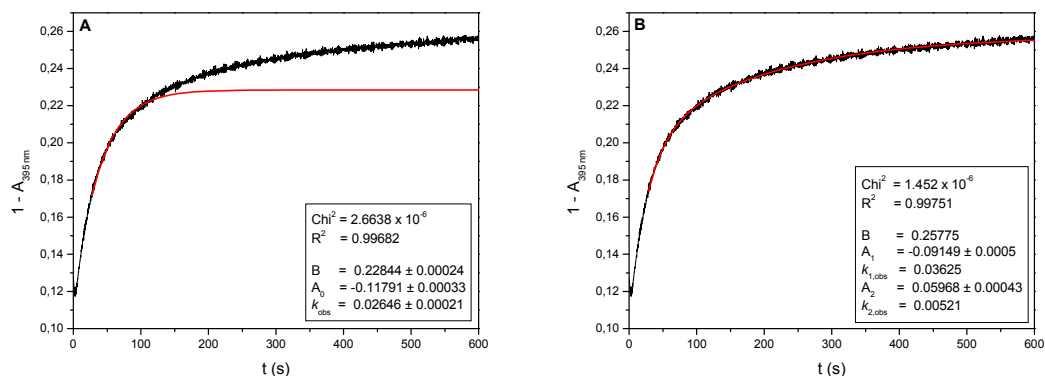


Abbildung 43 Kinetik der Absorptionsänderung der OsHRP bei 395 nm in Anwesenheit von 14 mM  $t\text{BuO}_2\text{H}$  bei pH 9,0, (A) einfach-exponentieller Fit, (B) doppelt-exponentieller Fit.

Bei einer Folgereaktion 1. Ordnung ist die Gleichung, welche die Konzentration des Intermediats beschreibt, eine doppelt-exponentielle Funktion. Dabei ist ein Exponentialkoeffizient ( $-k_1$ ) die negative Geschwindigkeitskonstante der ersten Reaktion, der andere ( $-k_2$ ) die der zweiten Reaktion. Die Summe der Konzentrationen des Edukts und des Intermediats wird ebenfalls von einer solchen doppelt-exponentiellen Funktion beschrieben. Die Exponentialkoeffizienten dieser Funktion sind ebenfalls jeweils die Geschwindigkeitskonstanten der beiden Funktionen, nur die Faktoren vor dem  $e^{-kt}$  unterscheiden sich von der Funktion für das Intermediat alleine.

Reaktionsart	Reaktionsschema	Integriertes Zeitgesetz
Pseudo-1. Ordnung	$A + B \xrightarrow{k_1} AB + (B)$	$[A] = [A_0] e^{-k_1[B_0]t}$
Folgereaktion 1. Ordnung	$A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C$	$[A] = [A_0] e^{-k_1 t}$ $[B] = \frac{[A_0] k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t})$

Tabelle 15 Integrierte Zeitgesetze für Folgereaktionen 1. Ordnung und Reaktionen pseudo-1. Ordnung.

Die Absorptionsänderung der OsHRP mit der Zeit wird durch folgende Gleichung gut beschrieben (Gleichung 21).

$$A_t = A_1 e^{-k_{1,\text{obs}} t} - A_2 e^{-k_{2,\text{obs}} t} + B \quad (21)$$

$A_t$  ist dabei die Absorption zum Zeitpunkt  $t$  und  $A_1$ ,  $A_2$  und  $B$  Konstanten.  $k_{1,\text{obs}}$  ist die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Reaktion von  $\text{Os}^{\text{III}}\text{HRP}$  zu  $[\text{OsHRP}]_Z$  und  $k_{2,\text{obs}}$  die Konstante für die Reaktion zu  $\text{Os}^{\text{VI}}\text{HRP}$  (Gleichung 20). Bei einer Reaktion pseudo-



1. Ordnung sind diese Geschwindigkeitskonstanten linear abhängig von der Peroxid-Konzentration, bei einer Reaktion 1. Ordnung sind sie unabhängig.

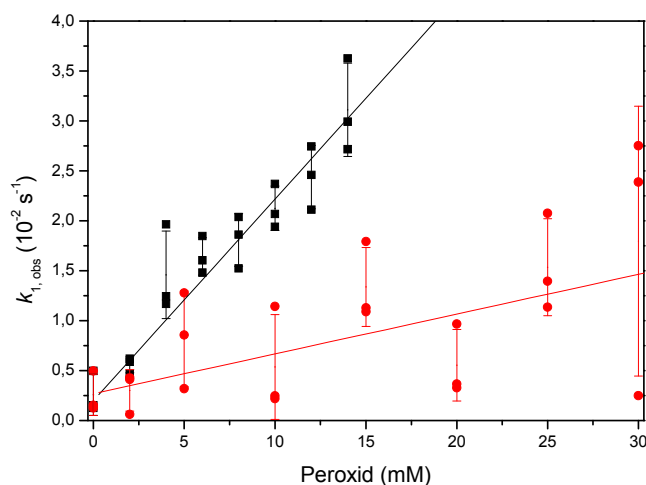


Abbildung 44 Konzentrationsabhängigkeit von  $k_{1,obs}$ , (■)  $t\text{BuO}_2\text{H}$ , (●)  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; pH 9,0

Die Reaktionsgeschwindigkeiten für je 7 verschiedene Konzentrationen an  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $t\text{BuO}_2\text{H}$  wurden gemessen und die beiden  $k_{obs}$ -Werte bestimmt. In Abbildung 44 wurden die  $k_{1,obs}$ -Werte gegen die Peroxid-Konzentration aufgetragen. Die erste Reaktion ist also eine Reaktion pseudo-1. Ordnung und  $\text{Os}^{\text{III}}\text{HRP}$  reagiert somit mit Peroxiden. Aus der linearen Regression ergibt sich bei pH 9,0 für  $\text{H}_2\text{O}_2$  ein apparenter  $k_1$ -Wert von  $0,40 \pm 0,14 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und für  $t\text{BuO}_2\text{H}$  ein  $k_{1,app}$ -Wert von  $2,02 \pm 0,18 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Tabelle 16). In der Literatur werden für  $\text{H}_2\text{O}_2$   $k_{app}$ -Werte von  $1,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (FeHRP, [212]) und  $1,70 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (MnHRP, [124]), also 4 bis 8 Größenordnungen größere Werte, angegeben.

	$\text{H}_2\text{O}_2$	$t\text{BuO}_2\text{H}$
OsHRP pH 9,0	$k_{1,app} = 0,40 \pm 0,14 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_{2,app} = 1,82 \pm 1,23 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$k_{1,app} = 2,02 \pm 0,18 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_{2,app} = 2,49 \pm 1,31 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
OsHRP pH 4,0	$k_{1,app} = 0,007 \pm 0,02 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_{2,app} = 1,47 \pm 0,77 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$k_{1,app} = 0,11 \pm 0,03 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ $k_{2,app} = 1,39 \pm 0,82 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
MnHRP pH 7	$k_{app} = 1,70 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [124]	$k_{app} = 9,64 \pm 2,2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [125]
FeHRP pH 7	$k_{app} = 1,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [212]	$k_{app} = 0,0 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [213]

Tabelle 16 Kinetische Konstanten der Reaktion von OsHRP, MnHRP und FeHRP mit Peroxiden.

Die Reaktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit  $\text{Os}^{\text{III}}\text{HRP}$  ist sehr langsam, was mit ein Grund für das Fehlen einer messbaren Substratumsetzung sein kann. Der  $k_{app}$ -Wert für die Reaktion von  $t\text{BuO}_2\text{H}$

mit der MnHRP ist mit  $9,64 \pm 2,2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [125] nur etwas größer als der für  $\text{Os}^{\text{III}}\text{HRP}$ . Bei der FeHRP wurde der  $k_{\text{app}}$ -Wert als  $0,0 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [213] angegeben, was bedeutet, dass die FeHRP nicht mit  $t\text{BuO}_2\text{H}$  reagiert. Es konnten aber Kohlenstoffpaste-Elektroden mit der FeHRP hergestellt werden, die auch  $t\text{BuO}_2\text{H}$  messen können [43, 44]. Es fällt auf, dass sowohl FeHRP als auch MnHRP wesentlich schneller mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  als mit  $t\text{BuO}_2\text{H}$  reagieren. Die OsHRP reagiert aber schneller mit  $t\text{BuO}_2\text{H}$  als mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Das Metall-Zentrum hat also einen Einfluss auf die Substratpräferenz des Enzyms.

Die Geschwindigkeitskonstanten wurden sowohl bei pH 9,0 als auch bei pH 4,0 bestimmt (Tabelle 16). Bei der ersten Reaktion sind die Werte bei pH 4,0 wesentlich kleiner als bei pH 9,0. Das pH-Optimum der OsHRP liegt also, im Gegensatz zu dem der FeHRP (Optimum pH 6 – 7), eher im Basischen. Auch ohne eine genaue Bestimmung des pH-Optimums ist zu erkennen, dass das Metall-Zentrum dieses beeinflusst. Das Optimum der MnHRP unterscheidet sich ebenfalls von dem der nativen HRP und liegt zwischen pH 7 und pH 9 [124].

In Abbildung 45 wurden die  $k_{2,\text{obs}}$ -Werte gegen die Peroxid-Konzentration aufgetragen. Der zweite  $k_{\text{obs}}$ -Wert ist konzentrationsunabhängig, die Reaktion also 1. Ordnung. Die in Tabelle 16 angegebenen Werte für  $k_{2,\text{app}}$  sind Mittelwerte aller jeweiligen  $k_{2,\text{obs}}$ -Werte. Die Geschwindigkeitskonstante der zweiten Reaktion scheint vom pH-Wert unabhängig zu sein. Allerdings wurden die Messungen bei einer Wellenlänge durchgeführt, die für keine der an dieser Reaktion beteiligten OsHRP-Formen optimal ist. Die hier bestimmten Geschwindigkeitskonstanten sind also nicht sehr genau.

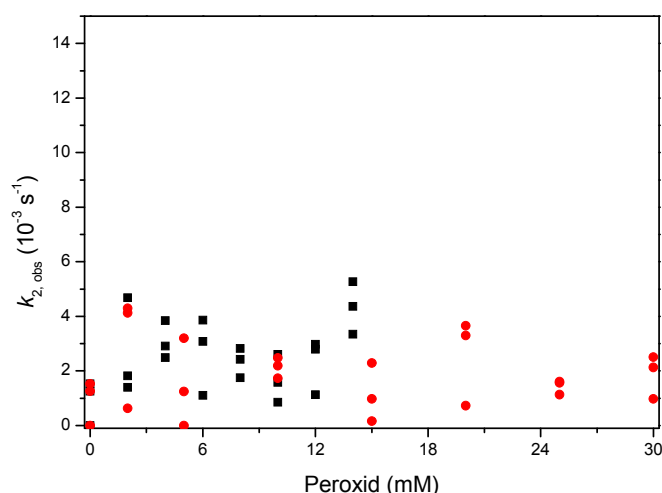


Abbildung 45 Konzentrationsabhängigkeit von  $k_{2,\text{obs}}$ , (■)  $t\text{BuO}_2\text{H}$ , (●)  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; pH 9,0.

Mit den aus den kinetischen Messungen gewonnen Erkenntnissen kann die Reaktion der OsHRP (Gleichung 20) genauer beschrieben werden (Gleichung 22).



### 5.3.5. (Spektr-)Elektrochemische Untersuchung der OsHRP

#### 5.3.5.1. Elektrochemie an Kohlenstoffelektroden

Die ersten elektrochemischen Untersuchungen der OsHRP wurden mit Kohlenstoff-Elektroden (GC und PG) durchgeführt, auf die OsHRP adsorbiert wurde. Auf diese Weise wurde allerdings kein eindeutig auf die OsHRP zurückzuführendes elektrochemisches Verhalten gefunden.

Durch Immobilisation in einem biomembranähnlichen Film konnte der Elektronentransfer zwischen Elektrode und Protein bei einigen Häm-Proteinen erleichtert werden [214-219]. Didodecyldimethylammonium-Bromid (ddab) kann für solche Filme verwendet werden.

Wurde die OsHRP in einem ddab-Film auf einer OH-reichen, hydrophilen PG-Elektrode immobilisiert, konnte der Elektronentransfer nicht verbessert werden. Wurde der OsHRP-haltige ddab-Film aber auf eine hydrophobe GC-Elektrode aufgebracht, konnten im CV Peaks der OsHRP gefunden werden (Abbildung 46).

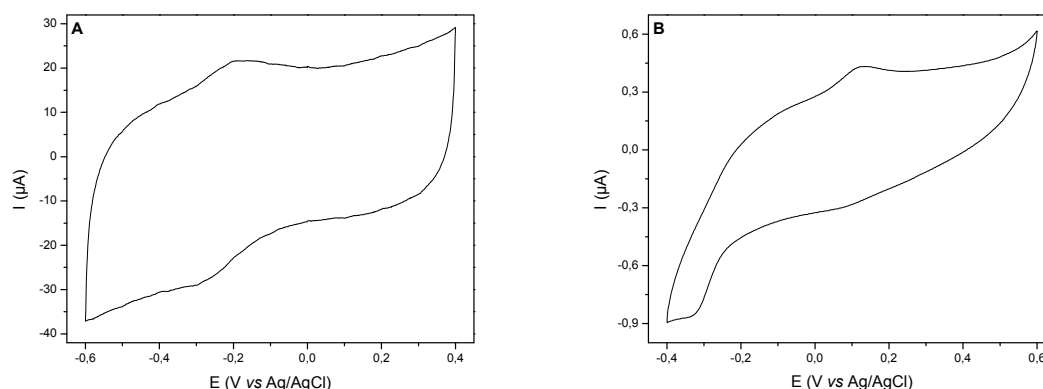


Abbildung 46 CV von OsHRP im ddab-Film auf GC-Elektrode, N<sub>2</sub>-begaster Phosphat-Puffer, pH 7,0, Vorschubgeschwindigkeit (A) 10 V/s, (B) 0,005 V/s (unterschiedliche Strom-Skalen).

Bei großen Vorschubgeschwindigkeiten (10 V/s) ist ein Redoxpaar mit einem Halbstufenpotential von -0,25 V zu finden. Bei langsamen Potentialänderungen (0,005 V/s) wird ein zweites Redoxpaar bei  $E_{1/2} = 0,10$  V sichtbar. FeHRP hat unter diesen Bedingungen ein Halbstufenpotential von -0,18 V.

In der Literatur wird für die FeHRP meist ein Halbstufenpotential um -0,4 V (Ag/AgCl) angegeben, welches dem Fe<sup>II</sup>HRP/Fe<sup>III</sup>HRP-Übergang zugeordnet wird [103, 220]. Wird

HRP in einem ddab-Film immobilisiert, so wird ein um etwa 0,2 V positiveres Halbstufenpotential gemessen [217].

Da beim Osmium-Porphyrin mehrere Redoxstufen elektrochemisch gemessen werden konnten, ist hier eine Zuordnung der Halbstufenpotentiale der OsHRP nicht ohne weiteres möglich.

### 5.3.5.2. Elektrochemie an ITO-Elektroden

Die Spektroelektrochemie ist eine Methode, mit der ein direkter Zusammenhang zwischen Redoxübergängen und Änderungen im Absorptionsspektrum hergestellt werden kann. Dadurch wird eine Zuordnung der gemessenen Halbstufenpotentiale zu Redoxübergängen möglich. Für die Durchführung ist eine optisch transparente Elektrode nötig. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von Indiumzinnoxid- (ITO-, engl. indium tin oxide) Elektroden.

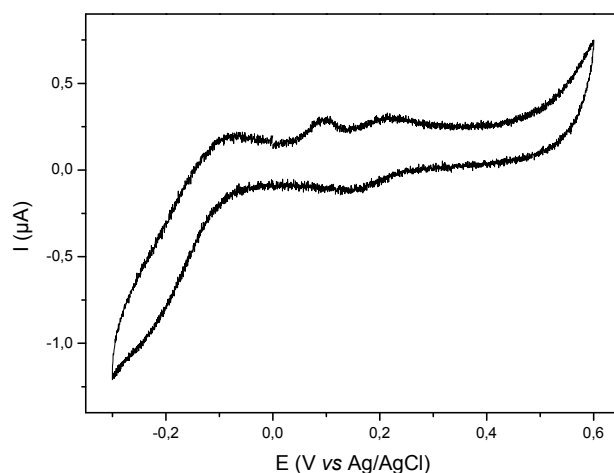


Abbildung 47 CV von OsHRP in Lösung an einer ITO-Elektrode, Phosphat-Puffer, pH 9,0, Vorschubgeschwindigkeit 0,01 V/s.

Das CV von OsHRP an ITO unterscheidet sich von der OsHRP im ddab-Film auf einer GC-Elektrode (Abbildung 47). Hier sind zwar ebenfalls zwei Redoxpaare sichtbar, aber bei  $E_{1/2} = -0,16$  mV und 0,18 V. Weiterhin ist ein zusätzlicher Oxidationspeak bei 0,1 V zu sehen. Die Unterschiede sind auf mehrere Faktoren zurückzuführen. Die Halbstufenpotentiale redoxaktiver Substanzen können sich etwas unterscheiden, wenn sie mit verschiedenen Elektroden gemessen werden. Weiterhin ist bei den Messungen an der ITO-Elektrode die OsHRP in Lösung, im Gegensatz zum adsorbierten Enzym an der GC-Elektrode.

Vor allem aber verschiebt der bei der Immobilisierung auf der GC-Elektrode verwendete ddab-Film die Halbstufenpotentiale [217]. Unter Berücksichtigung dieser Verschiebung ist das Halbstufenpotential bei +0,1 V bei der GC-Elektrode mit dem bei -0,16 V bei der ITO-Elektrode vergleichbar.

### 5.3.5.3. Spektroelektrochemie

Um die Halbstufenpotentiale bestimmten Redoxvorgängen zuordnen zu können, wurden UV-VIS-Spektren bei verschiedenen Potentialen aufgenommen. Wird ein Potential von -0,6 V an die ITO-Elektrode angelegt, so zeigt das Spektrum der OsHRP eine Soret-Bande bei 395 nm, das der Os<sup>III</sup>HRP entspricht (Abbildung 48).

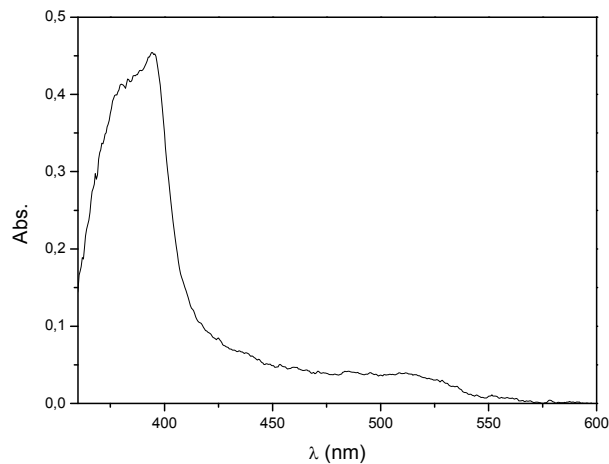


Abbildung 48 Absorptionsspektrum der OsHRP bei -0,6 V (Ag/AgCl), ITO-Elektrode, Phosphat-Puffer, pH 9,0.

Um zu bestimmen, bei welchem Potential sich die Soret-Bande verschiebt, wurde der Quotient aus der Absorption bei zwei Wellenlängen (386 nm und 395 nm) gegen das Potential aufgetragen (Abbildung 49). Eine Änderung dieses Quotienten zeigt eine Verschiebung der Soret-Bande an.

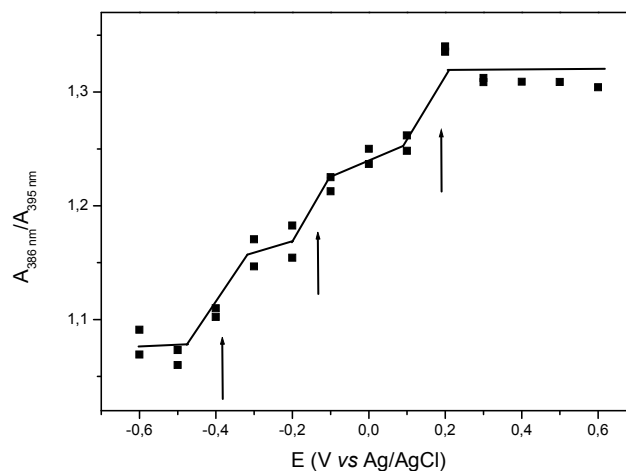


Abbildung 49 Potentialabhängigkeit des Quotienten aus  $A_{386\text{ nm}}$  und  $A_{395\text{ nm}}$  der OsHRP, Phosphat-Puffer, pH 9,0; Pfeile: Änderung der Soret-Bande.

Bei -0,6 V liegt die OsHRP im dreiwertigen Zustand vor. Um -0,4 V ändert sich der Redoxzustand auf die nächst höhere Oxidationsstufe, dem Os<sup>IV</sup>HRP. Der Os<sup>IV</sup>HRP/Os<sup>V</sup>HRP-Übergang hat ein Redoxpotential im Bereich der zweiten Änderung von  $A_{386\text{ nm}}/A_{395\text{ nm}}$ , also zwischen -0,2 V und -0,1 V. Eine dritte Änderung des Quotienten zeigt, dass das Redoxpotential des Os<sup>V</sup>HRP/Os<sup>VI</sup>HRP-Übergangs um +0,2 V liegt.

Elektrochemisch können also vier Redoxzustände der OsHRP von Os<sup>III</sup>HRP bis Os<sup>VI</sup>HRP nachgewiesen werden.

#### 5.3.5.4. Redoxpotentiale der OsHRP

Mit Hilfe der durch die spektroelektrochemischen Messungen (Abschnitt 5.3.5.3) erhaltenen Redoxübergänge der OsHRP können die Halbstufenpotentiale der zyklischen Voltammogramme (GC/ddab-Elektrode, Abschnitt 5.3.5.1 bzw. ITO-Elektrode, Abschnitt 5.3.5.1) zugeordnet werden. Die Zuordnung ist in Tabelle 17 zusammengefasst.

	$E_{1/2}$ (V vs. Ag/AgCl)	
	GC/ddab	ITO
Os <sup>III</sup> HRP/Os <sup>IV</sup> HRP	-0,25	
Os <sup>IV</sup> HRP/Os <sup>V</sup> HRP	+0,10	-0,16
Os <sup>V</sup> HRP/Os <sup>VI</sup> HRP		+0,18

Tabelle 17 Redoxpotentiale der OsHRP; GC/ddab: immobilisiert in ddab-Film, GC-Elektrode, Phosphat-Puffer, pH 7,0; ITO: in Lösung, ITO-Elektrode, Phosphat-Puffer, pH 9,0.

Mit der ITO-Elektrode wurden zwei Halbstufenpotentiale bei -0,16 V und +0,18 V gemessen (Abbildung 47). Der Redoxvorgang von -0,16 V liegt zwischen -0,1 V und -0,2 V und kann somit dem Os<sup>IV</sup>HRP/Os<sup>V</sup>HRP-Übergang zugeordnet werden. +0,18 V ist nahe +0,2 V und wird damit dem Os<sup>V</sup>HRP/Os<sup>VI</sup>HRP-Übergang zugeordnet.

Bei der in einem ddab-Film auf einer GC-Elektrode immobilisierten OsHRP wurden Halbstufenpotentiale bei -0,25 V und +0,10 V gemessen (Abbildung 46). Unter Berücksichtigung der Verschiebung um 0,2 V durch den ddab-Film, kann der Redoxvorgang bei -0,25 V dem Os<sup>III</sup>HRP/Os<sup>IV</sup>HRP-Übergang (um -0,4 V an ITO) und der Vorgang bei +0,10 V dem Os<sup>IV</sup>HRP/Os<sup>V</sup>HRP-Übergang (-0,16 V an ITO) zugeordnet werden.

#### 5.3.6. Elektrochemie in Gegenwart von Peroxiden

Um den katalytischen Umsatz von Peroxiden durch auf einer Elektrode immobilisierte OsHRP zu untersuchen, wurden zyklische Voltammogramme in Abwesenheit und Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder *t*BuO<sub>2</sub>H mit sehr kleinen Vorschubgeschwindigkeiten (0,0005 V/s) aufgenommen. Für diese Messungen wurde eine GC-Elektrode verwendet auf der OsHRP in einem ddab-Film immobilisiert wurde. Abbildung 50 zeigt die CVs in Abwesenheit und in

Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Das CV in Gegenwart von  $t\text{BuO}_2\text{H}$  war dem in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ähnlich.

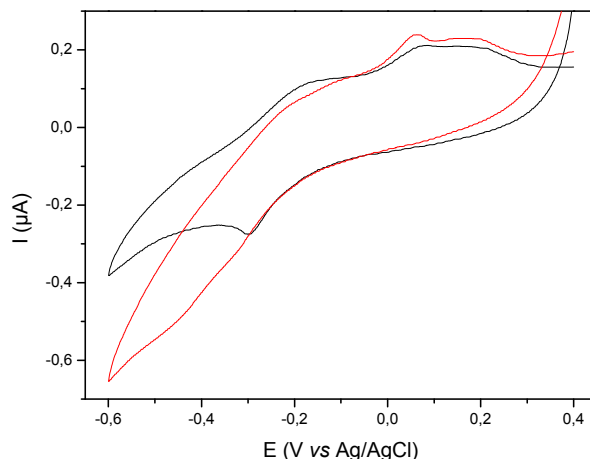
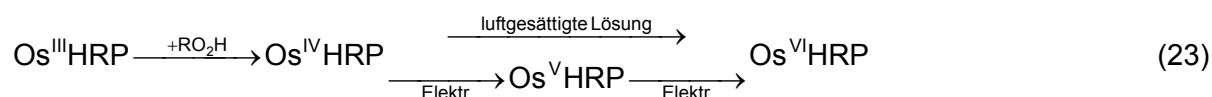


Abbildung 50 CV von OsHRP im ddab-Film, GC-Elektrode, Vorschubgeschwindigkeit 0,0005 V/s, Phosphat-Puffer, pH 7,0, (—) mit und (—) ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Beim positiveren Redoxpaar ( $E_{1/2} = 0,10 \text{ V}$ ,  $\text{Os}^{\text{IV}}\text{HRP}/\text{Os}^{\text{V}}\text{HRP}$ ) wird in Gegenwart von Peroxid die Oxidation scheinbar verstärkt. Beim negativeren Redoxpaar ( $E_{1/2} = -0,25 \text{ V}$ ,  $\text{Os}^{\text{III}}\text{HRP}/\text{Os}^{\text{IV}}\text{HRP}$ ) nimmt die Oxidation ab und die Reduktion zu.

In Gegenwart von Peroxid kann also mehr  $\text{Os}^{\text{IV}}\text{HRP}$  zu  $\text{Os}^{\text{III}}\text{HRP}$  reduziert und weniger  $\text{Os}^{\text{III}}\text{HRP}$  zu  $\text{Os}^{\text{IV}}\text{HRP}$  oxidiert werden. Weiterhin kann auch mehr  $\text{Os}^{\text{IV}}\text{HRP}$  zu  $\text{Os}^{\text{V}}\text{HRP}$  oxidiert werden. Der Anteil an  $\text{Os}^{\text{IV}}\text{HRP}$  an der Gesamt-OsHRP nimmt demnach zu und der Anteil an  $\text{Os}^{\text{III}}\text{HRP}$  ab. Peroxid oxidiert demzufolge die  $\text{Os}^{\text{III}}\text{HRP}$  zu  $\text{Os}^{\text{IV}}\text{HRP}$ .

Hieraus lässt sich schließen, dass die bei den kinetischen Untersuchungen (Abschnitt 5.3.4) mit  $[\text{OsHRP}]_z$  bezeichnete Zwischenform in der Reaktion der OsHRP die  $\text{Os}^{\text{IV}}\text{HRP}$  ist. Damit kann Gleichung 22 zu Gleichung 23 ergänzt werden.



Oxidationen durch Peroxide sind im Allgemeinen Zwei-Elektronen-Reaktionen. Bei der FeHRP wird das Eisen in einem ersten Schritt von  $\text{Fe}^{\text{III}}$  zu  $\text{Fe}^{\text{IV}}$  oxidiert. Der zweite Oxidationsort ist am Porphyrin-Ring, wo das Elektron im  $\pi$ -System delokalisiert wird [221]. Bei der MnHRP wird ebenfalls das Metall in einer ersten Oxidation von  $\text{Mn}^{\text{III}}$  zu  $\text{Mn}^{\text{IV}}$  oxidiert. Der zweite Oxidationsort liegt hier in der Proteinmatrix [127].

Weder Eisen noch Mangan können Oxidationsstufen größer als (IV) einnehmen, so dass die zweite Oxidation nicht am Metall stattfinden kann. Osmium kann dagegen auch als  $\text{Os}^{\text{V}}$  und  $\text{Os}^{\text{VI}}$  vorliegen. Würde die  $\text{Os}^{\text{III}}\text{HRP}$  durch Peroxid in einer Zwei-Elektronen-Oxidation des

Metalls zu  $\text{Os}^{\text{V}}\text{HRP}$  oxidiert werden, so müsste in Abbildung 50 beim positiveren Redoxpaar ( $E_{1/2} = 0,10 \text{ V}$ ,  $\text{Os}^{\text{IV}}\text{HRP}/\text{Os}^{\text{V}}\text{HRP}$ ) in Gegenwart von Peroxid die Reduktion verstärkt werden, da der Anteil an  $\text{Os}^{\text{V}}\text{HRP}$  ansteigen würde. Da dies aber nicht der Fall ist, ist es wahrscheinlich, dass  $\text{Os}^{\text{III}}\text{HRP}$  durch Peroxid nur bis zu  $\text{Os}^{\text{IV}}\text{HRP}$  oxidiert.

Auch eine Zwei-Elektronen-Oxidation ähnlich der FeHRP oder der MnHRP, bei der die zweite Oxidation am Porphyrin-Ring bzw. der Proteinmatrix stattfindet, ist unwahrscheinlich, da die elektrochemischen Untersuchungen des Os-Porphyrins darauf hin deuten, dass das  $\text{Os}^{\text{IV}}$  leichter zu  $\text{Os}^{\text{V}}$  oxidiert wird als der Porphyrin-Ring.

Das Fehlen einer messbaren Aktivität der OsHRP kann durch das Fehlen einer zweiten Oxidation und dadurch einer aktivierten Spezies erklärt werden. Bei der FeHRP entsteht durch die zweite Oxidation ein Radikal am Porphyrin-Ring, das sehr leicht ein Elektron von einem Donor aufnimmt. Die radikalische Natur der prosthetischen Gruppe im FeHRP-I ist mit ein Grund für die hohe Aktivität der FeHRP. Bei der MnHRP liegt das Radikal in der Proteinmatrix. Die geringe Aktivität der MnHRP kann dadurch erklärt werden, dass ein Elektron nicht ganz so leicht von einem Donor im aktiven Zentrum auf das Radikal in der Proteinmatrix übertragen wird. Bei der OsHRP fehlt die Oxidation zum Radikal und dadurch die reaktive Form Compound I.

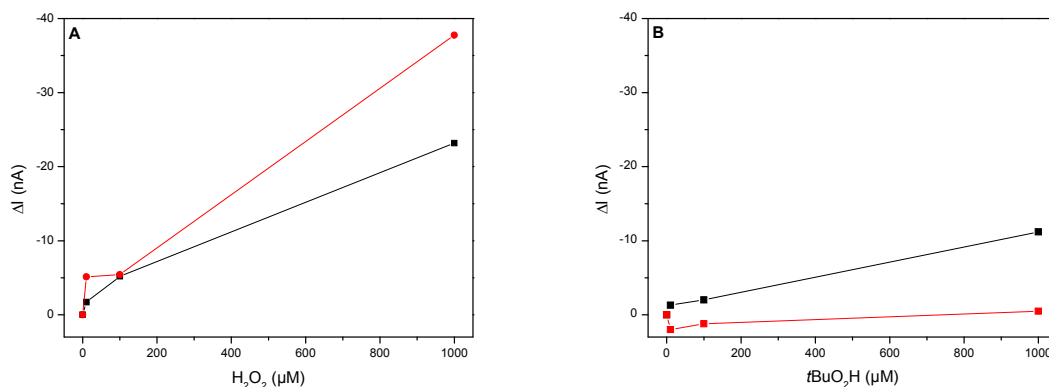


Abbildung 51 Amperometrische Messung von (A)  $\text{H}_2\text{O}_2$  und (B)  $t\text{BuO}_2\text{H}$  mit einer (■) OsHRP/ddab-GC- bzw. (●) FeHRP/ddab-GC-Elektrode bei  $-0,4 \text{ V}$ , Phosphat-Puffer, pH 7,0.

Amperometrisch zeigt die OsHRP/ddab-GC-Elektrode keine Reaktion auf  $\text{H}_2\text{O}_2$ - oder  $t\text{BuO}_2\text{H}$ -Zugabe bei  $-0,1 \text{ V}$  (Messung von  $\text{Os}^{\text{IV}}\text{HRP}$ ) und  $+0,2 \text{ V}$  ( $\text{Os}^{\text{V}}\text{HRP}$ ), nur bei  $-0,4 \text{ V}$  ( $\text{Os}^{\text{III}}\text{HRP}$ ) (Abbildung 51).

$\text{H}_2\text{O}_2$  wird an einer FeHRP-modifizierten Elektrode besser angezeigt als an einer OsHRP-modifizierten Elektrode (Abbildung 51A). Allerdings ist der Unterschied nicht so groß, wie auf



Grund der kinetischen Daten erwartet. Der Reduktionsstrom bei 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  an der OsHRP-modifizierten Elektrode beträgt etwa 60 % des entsprechenden Stroms an der FeHRP-modifizierten Elektrode, während die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit der OsHRP etwa 8 Größenordnungen kleiner ist als die Konstante für die FeHRP (Tabelle 16).  $\text{H}_2\text{O}_2$  scheint also mit der immobilisierten OsHRP sehr viel schneller zu reagieren als mit OsHRP in Lösung.

Bei der Messung von  $t\text{BuO}_2\text{H}$  ist das Signal wie erwartet bei der OsHRP-modifizierten Elektrode größer als bei der FeHRP-modifizierten Elektrode (Abbildung 51B).  $t\text{BuO}_2\text{H}$  kann also mit einer OsHRP-modifizierten Elektrode empfindlicher gemessen werden.

Beim Vergleich der  $\text{H}_2\text{O}_2$ - und der  $t\text{BuO}_2\text{H}$ -Messung mit der OsHRP-modifizierten Elektrode fällt allerdings auf, dass bei -0,4 V  $\text{H}_2\text{O}_2$  besser als  $t\text{BuO}_2\text{H}$  reduziert wird (Abbildung 51, schwarz). Nach den kinetischen Parametern für die Reaktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $t\text{BuO}_2\text{H}$  sollte  $t\text{BuO}_2\text{H}$  etwa 5 – 10-mal besser reduziert werden. Die Reduktion der Peroxide wird also durch die Immobilisierung auf der Elektrode unterschiedlich beeinflusst.

Wie bereits beschrieben, werden Peroxide durch die OsHRP, im Gegensatz zur FeHRP oder auch MnHRP, nur durch ein Elektron reduziert. Beim immobilisierten Enzym können Peroxide durch Elektronen von der Elektrode weiter reduziert werden, so dass die Gesamtreaktion eine Zwei-Elektronen-Reduktion der Peroxide ist.

## **6. Zusammenfassung**

In dieser Arbeit wurden am Beispiel von mit Meerrettich Peroxidase modifizierten Elektroden drei Aspekte der Biosensorik anhand der Wasserstoffperoxid-Messung näher untersucht und weiterentwickelt.

Im ersten Teil (A) wurden in zwei Studien neue Anwendungsgebiete des  $\text{H}_2\text{O}_2$ -messenden HRP-Sensors untersucht.

$\text{H}_2\text{O}_2$  ist ein relativ stabiler Vertreter der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und entsteht unter anderem auch durch Zerfall von anderen Substanzen dieser Stoffklasse, darunter Superoxid ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). Neutrophile Granulozyten, an der unspezifischen Immunabwehr beteiligte weiße Blutkörperchen, produzieren  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , um damit Zellen abzutöten, die sie durch Phagozytose aufgenommen haben. Das beim Abbau des Superoxids entstehende  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist stabil genug, dass es in die Lunge gelangen und ausgeatmet werden kann. Es ist im Atemkondensat nachweisbar und wird als nicht-invasiv messbarer klinischer Parameter bei Atemwegserkrankungen untersucht [74, 77, 79, 81].

Während einer Chemotherapie sinkt die Anzahl an Neutrophilen im Blut zeitweise stark ab und muss daher zum Schutz des Patienten ständig überwacht werden. Dazu wird den Patienten zurzeit regelmäßig Blut abgenommen und die Anzahl der verschiedenen Blutzellen ausgezählt.

In einer klinischen Pilotstudie zur nicht-invasiven Verlaufskontrolle der Chemotherapie an Brustkrebs-Patientinnen wurde festgestellt, dass die Menge an ausgeatmetem  $\text{H}_2\text{O}_2$  nicht genau die Anzahl der Neutrophilen im Blut widerspiegelt. Dennoch schließen die Ergebnisse nicht aus, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  zusammen mit anderen nicht-invasiv messbaren Markern zur Verlaufskontrolle geeignet ist. Das parallel dazu untersuchte Laktat ist kein geeigneter Marker für eine Verlaufskontrolle.

Laktat entsteht beim anaeroben Stoffwechsel, im Muskel vor allem unter starker Belastung. In der Sportmedizin ist die anaerobe Schwelle, d.h. die Belastungsstufe, bei der der Organismus vom aeroben auf den anaeroben Stoffwechsel wechselt, ein entscheidender Parameter für die Trainingsüberwachung. Zur Bestimmung der anaeroben Schwelle wird zurzeit der Laktatgehalt im Blut bestimmt.

In einer Vorstudie zur nicht-invasiven Bestimmung der anaeroben Schwelle und Trainingsüberwachung in der Sportmedizin wurde festgestellt, dass die Messung von ausgeatmetem Laktat grundsätzlich ebenfalls geeignet ist, allerdings noch mit geringerer Genauigkeit.  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist für eine Bestimmung der anaeroben Schwelle nur wenig geeignet. Weiterhin wurde übereinstimmend mit der Literatur [200-202] festgestellt, dass sich die Laktat-Konzentration im Vollblut und im Hämolysat unterscheiden. Der Unterschied wird durch den Hämatokrit und das Verhältnis der Laktat-Konzentrationen im Plasma und in den Erythrocyten verursacht. In dieser Vorstudie war zu sehen, dass der Unterschied während

des Trainings nicht konstant bleibt. Eine hierauf aufbauende Studie kann einen besseren Einblick in die Physiologie des Blutes während einer Belastungsphase geben.

Im Teil B wurde ein neues Elektrodenmaterial auf der Basis von pyrolysiertem CoTMPP hergestellt, wodurch die Elektronentransferrate von Elektrode zur nativen HRP um ein vielfaches erhöht wurde.

Bei Paste-Elektroden aus pyrolysiertem CoTMPP wird der Elektronentransfer zwischen Elektrodenmaterial und HRP durch Zusatz von Mediatoren nicht beschleunigt. Eine so hohe Effizienz im direkten Elektronentransfer (DET) konnte bisher nur mit rekombinanter HRP (bis zu 100 % DET) [99] oder mit Peroxidase aus anderen Quellen, wie Süßkartoffel (91 % DET) oder Tabak (68 % DET) [102], beobachtet werden.

Durch Zugabe von Eisenoxalat und Schwefel bei der Pyrolyse konnte der Reduktionsstrom für  $\text{H}_2\text{O}_2$  der HRP-modifizierten Paste-Elektroden erhöht werden. Durch den Zusatz werden die spezifische Oberfläche und die Porengröße des Pyrolyseprodukts beeinflusst. Weiterhin wird in der Literatur beschrieben, dass sauerstoffhaltige Oberflächengruppen den Elektronentransfer zwischen HRP und Kohlenstoffmaterialien beschleunigen können [107]. Daher wurde der Einfluss von Schwefelzusatz bei der Pyrolyse, von chemischen Nachbehandlungen zur Oberflächenmodifikation und von der spezifischen Oberfläche sowie der Porengröße auf den Reduktionsstrom für  $\text{H}_2\text{O}_2$  untersucht.

Es konnte kein signifikanter Unterschied im Elektronentransfer zwischen HRP und Elektrodenmaterial festgestellt werden, der auf unterschiedliche Mengen an Schwefelzusatz vor der Pyrolyse zurückzuführen war.

Durch chemische Nachbehandlungen, die zu einer sauerstoffreichen Oberfläche führen, konnte keine Erhöhung des Reduktionsstroms für  $\text{H}_2\text{O}_2$  erreicht werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass hier der Elektronentransfermechanismus keine sauerstoffreiche Oberflächengruppen beinhaltet.

Den größten Einfluss auf den Elektronentransfer hatten die spezifische Oberfläche und die Größe der Poren des pyrolysierten Materials. Durch eine große spezifische Oberfläche bei gleichzeitig großen Poren konnte der Elektronentransfer zur HRP ( $k_s = 3,5 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$ ) im Vergleich zum festen Graphit ( $k_s = 1,9 \text{ s}^{-1}$ , [35]) erhöht werden.

Die höchste Elektronentransfargeschwindigkeit konnte aber mit einem Material gemessen werden, dessen Poren die Größe des Enzyms haben ( $k_s = 401 \pm 61 \text{ s}^{-1}$ ). Eine Elektronentransferrate dieser Größe legt nahe, dass eine Art intrinsischer Mediator während der Präparation dieses Materials gebildet wird, ähnlich wie für hitzebehandelte Glaskohlenstoffelektroden beschrieben wurde [107].

Dies zeigt, dass es möglich ist, Elektrodenmaterialien speziell für ein Redoxenzym zu designen, um die Elektronentransferrate zu erhöhen. In Zukunft kann ein solches Designen

von Elektrodenmaterialien zur Verbesserung von Biosensoren der dritten Generation beitragen.

Im dritten Teil (C) wurde durch Austausch des Eisen-Porphyrins im aktiven Zentrum durch Osmium-Porphyrin erstmals ein neues HRP-Derivat, die OsHRP, hergestellt. Bisher wurden in der Literatur nur HRP-Derivate beschrieben, bei denen das Eisen-Zentralatom durch Metalle aus derselben Periode, v.a. Mangan, ersetzt wurde [124-132]. Nur bei Myoglobin wurden auch Homologe des Eisens für eine solche Metallsubstitution verwendet [121-123]. Osmium ist ein Homologes des Eisens und kann als 5d-Metall höhere Oxidationsstufen einnehmen. Daher können bei der osmiumsubstituierten HRP interessante elektrochemische Eigenschaften vermutet werden.

In dieser Arbeit wurde die OsHRP elektrochemisch mit verschiedenen Elektroden und kinetisch bei zwei pH-Werten mittels UV-VIS-Spektrometrie charakterisiert.

Elektrochemisch konnten drei Redoxübergänge gemessen werden:  $\text{Os}^{\text{III}}\text{HRP}/\text{Os}^{\text{IV}}\text{HRP}$  mit  $E_{1/2} = -0,25 \text{ V}$  (GC/ddab),  $\text{Os}^{\text{IV}}\text{HRP}/\text{Os}^{\text{V}}\text{HRP}$  mit  $E_{1/2} = -0,16 \text{ V}$  (ITO) bzw.  $+0,10 \text{ V}$  (GC/ddab) und  $\text{Os}^{\text{V}}\text{HRP}/\text{Os}^{\text{VI}}\text{HRP}$  mit  $E_{1/2} = +0,18 \text{ V}$  (ITO). Dabei liegen übereinstimmend mit der Literatur [217] die Halbstufenpotentiale bei einer Immobilisierung im ddab-Film um etwa 0,2 V weiter positiv.

Die kinetischen Untersuchungen zeigen, dass die OsHRP um 4 bis 8 Größenordnungen langsamer mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagiert als die native HRP oder auch die mangansubstituierte HRP [124, 212]. Wie auch bei der MnHRP und im Gegensatz zur FeHRP liegt das pH-Optimum dabei näher bei pH 9 als bei pH 4 [124].

Die Substratpräferenz unterscheidet sich von der FeHRP und MnHRP. Sowohl FeHRP als auch MnHRP reagieren sehr viel schneller mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ , die OsHRP reagiert dagegen bevorzugt mit dem organischen Peroxid  $t\text{BuO}_2\text{H}$  ( $k_{1,\text{app}} = 2,02 \pm 0,18 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für  $t\text{BuO}_2\text{H}$  und  $0,40 \pm 0,14 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Sowohl  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{HRP}$  und  $\text{Mn}^{\text{III}}\text{HRP}$  werden durch Peroxid in einer Zwei-Elektronen-Reaktion zur vierwertigen, radikalischen Form oxidiert. Dabei liegt das Radikal bei der  $[\text{Fe}^{\text{IV}}\text{HRP}]^{\cdot}$  (FeHRP-I) im Porphyrin-Ring und bei der  $[\text{Mn}^{\text{IV}}\text{HRP}]^{\cdot}$  (MnHRP-I) in der Proteinmatrix. Die  $\text{Os}^{\text{III}}\text{HRP}$  dagegen wird durch Peroxid nur in einer Ein-Elektron-Reaktion zur  $\text{Os}^{\text{IV}}\text{HRP}$  oxidiert.

$\text{Os}^{\text{IV}}\text{HRP}$  ist in luftgesättigter Lösung instabil und oxidiert spontan bis zur  $\text{Os}^{\text{VI}}\text{HRP}$ .

Eine enzymatische Aktivität der OsHRP, d.h. eine Reduktion von Peroxid bei gleichzeitiger Oxidation eines Substrats, war nicht feststellbar.

Amperometrisch konnten mit einer GC-Elektrode, auf der OsHRP in einem ddab-Film immobilisiert wurde, bei  $-0,4 \text{ V}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $t\text{BuO}_2\text{H}$  gemessen werden. Bei einer Messung von  $1 \text{ mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  war dabei das Signal etwa 60 % des entsprechenden Signals bei Immobilisierung von FeHRP. Das organische  $t\text{BuO}_2\text{H}$  konnte mit der OsHRP-modifizierten Elektrode empfindlicher gemessen werden als mit der FeHRP-modifizierten Version.

## **7. Literatur**

1. Sawyer, D.T., Heineman, W.R. und Beebe, J.M., *Chemistry Experiments for Instrumental Methods*, **1984**, John Wiley & Sons, New York.
2. Duschek, O. und Gutmann, V., *Bisbiphenylchrom(l) und Ferrocen als Bezugsredoxsysteme zum Vergleich von Halbwellenpotentialen in verschiedenen Lösungsmitteln*, Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly, **1973**, 104 (4): 990-997.
3. Thévenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A. und Wilson, G.S., *Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification*, Pure and Applied Chemistry, **1999**, 71 (12): 2333-2348.
4. Scheller, F.W., Wollenberger, U., Warsinke, A. und Lisdat, F., *Research and development in biosensors*, Current Opinion in Biotechnology, **2001**, 12 (1): 35-40.
5. Lippa, P.B., Sokoll, L.J. und Chan, D.W., *Immunosensors - Principles and Applications to Clinical Chemistry*, Clinica Chimica Acta, **2001**, 314 (1-2): 1-26.
6. Nakamura, H. und Karube, I., *Current Research Activity in Biosensors*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2003**, 377 (3): 446-468.
7. Bosch, M.E., Sánchez, A.J.R., Rojas, F.S. und Ojeda, C.B., *Recent Development in Optical Fiber Biosensors*, Sensors, **2007**, 7 (6): 797-859.
8. Leung, A., Shankar, P.M. und Mutharasan, R., *A Review of Fiber-Optic Biosensors*, Sensors and Actuators B, **2007**, 125 (2): 688-703.
9. Janshoff, A., Galla, H.-J. und Steinem, C., *Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors - An Alternative to Optical Biosensors?*, Angewandte Chemie, **2000**, 39: 4004-4032.
10. Bakker, E. und Telting-Diaz, M., *Electrochemical Sensors*, Analytical Chemistry, **2002**, 74 (12): 2781-2800.
11. Turner, A.P.F., Karube, I. und Wilson, G.S., *Biosensors: Fundamentals and Applications*, **1987**, Oxford University Press, Oxford, UK.
12. Schmidt, H.-L., Schuhmann, W., Scheller, F.W. und Schubert, F., *Specific Features of Biosensors*, in *Sensors: A Comprehensive Survey*, Hrg.: Göpel, W., Hesse, J. und Zemel, J.N., **1992**, VCH, Weinheim: 717.
13. Norde, W., *The Behavior of Proteins at Interfaces, with Special Attention to the Role of the Structure Stability of the Protein Molecule*, Clinical Materials, **1992**, 11 (1-4): 85-91.
14. Wahlgren, M. und Arnebrant, T., *Protein Adsorption to Solid Surfaces*, Trends in Biotechnology, **1991**, 9 (1): 201-208.
15. Emr, S.A. und Yacynych, A.M., *Use of Polymer Films in Amperometric Biosensors*, Electroanalysis, **1995**, 7 (10): 913-923.
16. Palmisano, F., Zambonin, P.G. und Centonze, D., *Amperometric Biosensors Based on Electrosynthesised Polymeric Films*, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, **2000**, 366 (6): 586-601.

17. Scheller, F.W., Lisdat, F. und Wollenberger, U., *Application of Electrically Contacted Enzymes for Biosensors*, in *Bioelectronics - From Theory to Applications*, Hrg.: Willner, I. und Katz, E., **2005**, Wiley-VCH, Weinheim: 99-126.
18. Ghindilis, A.L., Atanasov, P. und Wilkins, E., *Enzyme-Catalyzed Direct Electron Transfer: Fundamentals and Analytical Applications*, *Electroanalysis*, **1997**, 9 (9): 661-674.
19. Wollenberger, U., *Third Generation Biosensors - Integrating Recognition and Transduction in Electrochemical Sensors*, in *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques*, Hrg.: Gorton, L., **2005**, Elsevier, Amsterdam: 65-130.
20. Fultz, M.L. und Durst, R.A., *Mediator Compounds for the Electrochemical Study of Biological Redox Systems: A Compilation*, *Analytica Chimica Acta*, **1982**, 140 (1): 1-18.
21. Ohara, T.J., Rajagopalan, R. und Heller, A., *"Wired" Enzyme Electrodes for Amperometric Determination of Glucose or Lactate in the Presence of Interfering Substances*, *Analytical Chemistry*, **1994**, 66 (15): 2451-2457.
22. Vreeke, M., Maidan, R. und Heller, A., *Hydrogen Peroxide and  $\beta$ -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Sensing Amperometric Electrodes Based on Electrical Connection of Horseradish Peroxidase Redox Centers to Electrodes through a Three-Dimensional Electron Relaying Polymer Network*, *Analytical Chemistry*, **1992**, 64 (24): 3084-3090.
23. Jacobs, D.S., Demott, W.R., Finley, P.R., Horvat, R.T., Jr., B.L.K. und Tilzer, L.L., *Laboratory Test Handbook*, 3. Aufl., **1992**, Lexi-comp Inc., Hudson.
24. Anni, H. und Yonetani, T., *Mechanism of Action of Peroxidases*, in *Metal Ions in Biological Systems*, Hrg.: Sigel, H. und Sigel, A., **1992**, Marcel Dekker, New York: 219-241.
25. Everse, J., Everse, K.E. und Grisham, M.B., *Peroxidases in chemistry and biology*, Bd. II, **1991**, CRC Press, Boca Raton, FL.
26. Yamazaki, I., Tamura, M. und Nakajima, R., *Horseradish peroxidase C*, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **1981**, 40: 143-153.
27. Coates, A.I., Cook, M.P., Feezor, R. und Schuh, M.D., *Dependence of Heme Accessibility in Horseradish Peroxidase on  $Ca^{2+}$* , *Journal of Inorganic Biochemistry*, **1998**, 72 (1-2): 63-69.
28. Zimmermann, H., Lindgren, A., Schuhmann, W. und Gorton, L., *Anisotropic Orientation of Horseradish Peroxidase by Reconstitution on a Thiol-Modified Gold Electrode*, *Chemistry - A European Journal*, **2000**, 6 (4): 592-599.
29. Gajhede, M., Schuller, D.J., Henriksen, A., Smith, A.T. und Poulos, T.L., *Crystal Structure of Horseradish Peroxidase C at 2.15 Å Resolution*, *Nature Structural Biology*, **1997**, 4 (12): 1032-1038.



30. Yang, B.Y., Gray, J.S.S. und Montgomery, R., *The Glycans of Horseradish Peroxidase*, Carbohydrate Research, **1996**, 287: 203-212.
31. Zhang, J.D., Chi, Q.J., Dong, S.J. und Wang, E.K., *In Situ Electrochemical Scanning Tunnelling Microscopy Investigation of Structure for Horseradish Peroxidase and its Electrocatalytic Property*, Bioelectrochemistry and Bioenergetics, **1996**, 39 (2): 267-274.
32. Berglund, G.I., Carlsson, G.H., Smith, A.T., Szoke, H., Henriksen, A. und Hajdu, J., *The Catalytic Pathway of Horseradish Peroxidase at High Resolution*, Nature, **2002**, 417 (6887): 463-468.
33. Ruzgas, T., Csoregi, E., Emneus, J., Gorton, L. und MarkoVarga, G., *Peroxidase-Modified Electrodes: Fundamentals and Application*, Analytica Chimica Acta, **1996**, 330 (2-3): 123-138.
34. Morimoto, A., Tanaka, M., Takahashi, S., Ishimori, K., Hori, H. und Morishima, I., *Detection of a Tryptophan Radical as an Intermediate Species in the Reaction of Horseradish Peroxidase Mutant (Phe-221 → Trp) and Hydrogen Peroxide*, Journal of Biological Chemistry, **1998**, 273 (24): 14753-14760.
35. Lindgren, A., Munteanu, F.D., Gazaryan, I.G., Ruzgas, T. und Gorton, L., *Comparison of Rotating Disk and Wall-Jet Electrode Systems for Studying the Kinetics of Direct and Mediated Electron Transfer for Horseradish Peroxidase on a Graphite Electrode*, Journal of Electroanalytical Chemistry, **1998**, 458 (1-2): 113-120.
36. Farhangrazi, Z.S., Fossett, M.E., Powers, L.S. und Ellis, W.R., *Variable-Temperature Spectroelectrochemical Study of Horseradish-Peroxidase*, Biochemistry, **1995**, 34 (9): 2866-2871.
37. Kenten, R.H., *The Oxidation of Phenylacetaldehyde by Plant Saps*, Biochemical Journal, **1953**, 55: 350-360.
38. Yamazaki, I., Fujinaga, K., Takehara, I. und Takahashi, H., *Aerobic Oxidation of Triose Reductone by Crystalline Turnip Peroxidase*, Journal of Biochemistry, **1956**, 43 (3): 377-386.
39. Kenten, R.H., *The Oxidation of Indolyl-3-Acetic Acid by Waxpod Bean Root Sap and Peroxidase Systems*, Biochemical Journal, **1955**, 59: 110-121.
40. Montellano, P.R.O.d., *Control of the Catalytic Activity of Prosthetic Heme by the Structure of Hemoproteins*, Accounts of Chemical Research, **1987**, 20: 289-294.
41. Wang, J., Dempsey, E., Eremenko, A. und Smyth, M.R., *Organic-Phase Biosensing of Enzyme Inhibitors*, Analytica Chimica Acta, **1993**, 279 (2): 203-208.
42. Ruzgas, T., Emneus, J., Gorton, L. und Marko-Varga, G., *The Development of a Peroxidase Biosensor for Monitoring Phenol and Related Aromatic Compounds*, Analytica Chimica Acta, **1995**, 311 (3): 245-253.

43. Wollenberger, U., Wang, J., Ozsoz, M., Gonzalez-Romero, E. und Scheller, F., *Bulk Modified Enzyme Electrodes for Reagentless Detection of Peroxides*, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **1991**, 26: 287-296.
44. Wang, J., Freiha, B., Naser, N., Romero, E.G., Wollenberger, U. und Ozsoz, M., *Amperometric Biosensing of Organic Peroxides with Peroxidase-Modified Electrodes*, *Analytica Chimica Acta*, **1991**, 254: 81-88.
45. Tatsuma, T., Okawa, Y. und Watanabe, T., *Enzyme Monolayer- and Bilayer-Modified Tin Oxide Electrodes for the Determination of Hydrogen Peroxide and Glucose*, *Analytical Chemistry*, **1989**, 61 (21): 2352-2355.
46. Korell, U. und Spichiger, U.E., *Novel Membranes Amperometric Peroxide Biosensor Based on a Tetrathiafulvalene-p-Tetracyanoquinodimethane Electrode*, *Analytical Chemistry*, **1994**, 66 (4): 510-515.
47. Garguilo, M.G., Nhan Huynh, Proctor, A. und Michael, A.C., *Amperometric Sensors for Peroxide, Choline, and Acetylcholine Based on Electron Transfer between Horseradish Peroxidase and a Redox Polymer*, *Analytical Chemistry*, **1993**, 65 (5): 523-528.
48. Horrocks, B.R., Schmidtke, D., Heller, A. und Bard, A.J., *Scanning Electrochemical Microscopy. 24. Enzyme Ultramicroelectrodes for the Measurement of Hydrogen Peroxide at Surfaces*, *Analytical Chemistry*, **1993**, 65 (24): 3605-3614.
49. Tatsuma, T. und Watanabe, T., *Peroxidase Model Electrodes: Sensing of Imidazole Derivatives with Heme Peptide-Modified Electrodes*, *Analytical Chemistry*, **1992**, 64 (2): 143-147.
50. Liu, Y., Fiskum, G. und Schubert, D., *Generation of Reactive Oxygen Species by the Mitochondrial Electron Transport Chain*, *Journal of Neurochemistry*, **2002**, 80 (5): 780-787.
51. Lehninger, A.L., Nelson, D.L. und Cox, M.M., *Prinzipien der Biochemie*, 2. Aufl., **1994**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
52. Turrens, J.F. und Boveris, A., *Generation of Superoxide Anion by the NADH Dehydrogenase of Bovine Heart Mitochondria*, *Biochemical Journal*, **1980**, 191 (2): 421-427.
53. Turrens, J.F., Alexandre, A. und Lehninger, A.L., *Ubisemiquinone is the Electron Donor for Superoxide Formation by Complex III of Heart Mitochondria*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1985**, 237 (2): 408-414.
54. Sawyer, D.T., Gibian, M.J., Morrison, M.M. und Seo, E.T., *On the Chemical Reactivity of Superoxide Ion*, *Journal of the American Chemical Society*, **1978**, 100 (2): 627-628.
55. Morrison, M.M., Roberts, J.L. und Sawyer, D.T., *Oxidation-Reduction Chemistry of Hydrogen Peroxide in Aprotic and Aqueous Solutions*, *Inorganic Chemistry*, **1979**, 18 (7): 1971-1973.

56. Kern, D.M.H., *The Polarography and Standard Potential of the Oxygen-Hydrogen Peroxide Couple*, Journal of the American Chemical Society, **1954**, 76 (16): 4208-4214.
57. Behar, D., Czapski, G., Rabani, J., Dorfman, L.M. und Schwarz, H.A., *Acid Dissociation Constant and Decay Kinetics of the Perhydroxyl Radical*, Journal of Physical Chemistry, **1970**, 74 (17): 3209-3213.
58. Bertini, I., Mangani, S. und Viezzoli, M.S., *Structure and Properties of Copper-Zinc Superoxide Dismutases*, in *Advances in Inorganic Chemistry*, Hrg.: Sykes, A.G., **1998**, Academic Press Inc., San Diego: 127-250.
59. Ray, R. und Shah, A.M., *NADPH Oxidase and Endothelial Cell Function*, Clinical Science, **2005**, 109: 217-226.
60. Babior, B.M., Lambeth, J.D. und Nauseef, W., *The Neutrophil NADPH Oxidase*, Archives of Biochemistry and Biophysics, **2002**, 397 (2): 342-344.
61. McCafferty, J.B., Bradshaw, T.A., Tate, S., Greening, A.P. und Innes, J.A., *Effects of Breathing Pattern and Inspired Air Conditions on Breath Condensate Volume, pH, Nitrite, and Protein Concentrations*, Thorax, **2004**, 59 (8): 694-698.
62. Ganas, K., Loukides, S., Papatheodorou, G., Panagou, P. und Kalogeropoulos, N., *Total Nitrite/Nitrate in Expired Breath Condensate of Patients with Asthma*, Respiratory Medicine, **2001**, 95 (8): 649-654.
63. Hunt, J.F., Erwin, E., Palmer, L., Vaughan, J., Malhotra, N., Platts-Mills, T.A.E. und Gaston, B., *Expression and Activity of pH-regulatory Glutaminase in the Human Airway Epithelium*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, **2002**, 165 (1): 101-107.
64. Scheideler, L., Manke, H.G., Schwulera, U., Inacker, O. und Hammerle, H., *Detection of Nonvolatile Macromolecules in Breath - a Possible Diagnostic-Tool*, American Review of Respiratory Disease, **1993**, 148 (3): 778-784.
65. Tabak, L.A., *Point-of-Care Diagnostics Enter the Mouth*, Annals of the New York Academy of Sciences, **2007**, 1098 (1): 7-14.
66. Kharitonov, S.A. und Barnes, P.J., *Exhaled Markers of Pulmonary Disease*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, **2001**, 163 (7): 1693-1722.
67. Amerongen, A.v.N., Ligtenberg, A.J.M. und Veerman, E.C.I., *Implications for Diagnostics in the Biochemistry and Physiology of Saliva*, Annals of the New York Academy of Sciences, **2007**, 1098 (1): 1-6.
68. Mansson-Rahemtulla, B., Rahemtulla, F., Baldone, D.C., Pruitt, K.M. und Hjerpe, A., *Purification and Characterization of Human Salivary Peroxidase*, Biochemistry, **1988**, 27 (1): 233-239.
69. O'Brien, P.J., *Peroxidases*, Chemic-Biological Interactions, **2000**, 129 (1-2): 113-139.

70. Geßner, C., *Das Atemkondensat - nicht-invasiv gewonnene biochemische Informationen aus der Lunge*, Medizinische Fakultät, **2005**, Universitätsklinikum Leipzig, Leipzig.
71. Fridovich, I., *Superoxide Radical and Superoxide Dismutase*, Accounts of Chemical Research, **1972**, 5 (10): 321-326.
72. Nowak, D., Antczak, A., Krol, M., Pietras, T., Shariati, B., Bialasiewicz, P., Jeczowski, K. und Kula, P., *Increased Content of Hydrogen Peroxide in the Expired Breath of Cigarette Smokers*, European Respiratory Journal, **1996**, 9 (4): 652-657.
73. Antczak, A., Nowak, D., Shariati, B., Krol, M., Piasecka, G. und Kurmanowska, Z., *Increased Hydrogen Peroxide and Thiobarbituric Acid-Reactive Products in Expired Breath Condensate of Asthmatic Patients*, European Respiratory Journal, **1997**, 10 (6): 1235-1241.
74. Antczak, A., Nowak, D., Bialasiewicz, P. und Kasielski, M., *Hydrogen Peroxide in Expired Air Condensate Correlates Positively with Early Steps of Peripheral Neutrophil Activation in Asthmatic Patients*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, **1999**, 47: 119-126.
75. Horváth, I., Donnelly, L.E., Kiss, A., Kharitonov, S.A., Lim, S., Fan Chung, K. und Barnes, P.J., *Combined Use of Exhaled Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide in Monitoring Asthma*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, **1998**, 158 (4): 1042-1046.
76. Dekhuijzen, P., Aben, K., Dekker, I., Aarts, L., Wielders, P., van Herwaarden, C. und Bast, A., *Increased Exhalation of Hydrogen Peroxide in Patients with Stable and Unstable Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, **1996**, 154 (3): 813-816.
77. Kostikas, K., Papatheodorou, G., Psathakis, K., Panagou, P. und Loukides, S., *Oxidative Stress in Expired Breath Condensate of Patients With COPD*, Chest, **2003**, 124 (4): 1373-1380.
78. Loukides, S., Horváth, I., Wodehouse, T., Cole, P.J. und Barnes, P.J., *Elevated Levels of Expired Breath Hydrogen Peroxide in Bronchiectasis*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, **1998**, 158 (3): 991-994.
79. Loukides, S., Bouros, D., Papatheodorou, G., Lachanis, S., Panagou, P. und Siafakas, N.M., *Exhaled H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Steady-State Bronchiectasis: Relationship With Cellular Composition in Induced Sputum, Spirometry, and Extent and Severity of Disease*, Chest, **2002**, 121 (1): 81-87.
80. Worlitzsch, D., Herberth, G., Ulrich, M. und Doring, G., *Catalase, Myeloperoxidase and Hydrogen Peroxide in Cystic Fibrosis*, European Respiratory Journal, **1998**, 11 (2): 377-383.

81. Jöbssis, Q., Raatgeep, H., Schellekens, S., Kroesbergen, A., Hop, W. und de Jongste, J., *Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide in Exhaled Air of Children with Cystic Fibrosis during Antibiotic Treatment*, European Respiratory Journal, **2000**, 16 (1): 95-100.
82. Jatakanon, A., Uasuf, C., Maziak, W., Lim, S., Chung, K.F. und Barnes, P.J., *Neutrophilic Inflammation in Severe Persistent Asthma*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, **1999**, 160 (5): 1532-1539.
83. Lases, E.C., Durkens, V.A.M., Gerritsen, W.B.M. und Haas, F.J.L.M., *Oxidative Stress After Lung Resection Therapy: A Pilot Study*, Chest, **2000**, 117 (4): 999-1003.
84. Thurston, D.E. und Lobo, S.G.M.J., *The Chemotherapy of Cancer*, in *Introduction to the Principles of Drug Design and Action*, Hrg.: Smith, H.J., **1998**, Taylor & Francis, Amsterdam: 331-386.
85. Kleinig, H. und Maier, U., *Zellbiologie*, 4. Aufl., **1999**, Gustav Fischer, Stuttgart.
86. Bundschuh, G., Schneeweiß, B. und Bräuer, H., *Lexikon der Immunologie (Biotest)*, 2. Aufl., **1992**, Medical Service, München.
87. Marcus, R.A. und Sutin, N., *Electron Transfers in Chemistry and Biology*, Biochimica et Biophysica Acta, **1985**, 811 (3): 265-322.
88. Marcus, R.A., *Electron Transfer Reactions in Chemistry: Theory and Experiment (Nobel Lecture)*, Angewandte Chemie International Edition in English, **1993**, 32 (8): 1111-1121.
89. Marcus, R.A., *On the Theory of Oxidation-Reduction Reactions Involving Electron Transfer. I*, The Journal of Chemical Physics, **1956**, 24 (5): 966-978.
90. Moser, C.C., Keske, J.M., Warncke, K., Farid, R.S. und Dutton, P.L., *Nature of Biological Electron Transfer*, Nature, **1992**, 355 (6363): 796-802.
91. Schubert, F., Saini, S. und Turner, A.P.F., *Mediated Amperometric Enzyme Electrode Incorporating Peroxidase for the Determination of Hydrogen Peroxide in Organic Solvents*, Analytica Chimica Acta, **1991**, 245: 133-138.
92. Armada, M.P.G., Losada, J., Cuadrado, I., Alonso, B., González, B., Casado, C.M. und Zhang, J., *Preparation of Biosensors Based in a Siloxane Homopolymer with Interacting Ferrocenes for the Amperometric Detection of Peroxides*, Sensors and Actuators B, **2004**, 101: 143-149.
93. Mulchandani, A., Wang, C.-L. und Weetall, H.H., *Amperometric Detection of Peroxides with Poly(anilinomethylferrocene)-Modified Enzyme Electrodes*, Analytical Chemistry, **1995**, 67: 94-100.
94. Nakabayashi, Y. und Yoshikawa, H., *Amperometric Biosensors for Sensing of Hydrogen Peroxide Based on Electron Transfer between Horseradish Peroxidase and Ferrocene as a Mediator*, Analytical Sciences, **2000**, 16 (6): 609-613.

95. Liu, Z.M., Niwa, O., Horiuchi, T., Kurita, R. und Torimitsu, K., *NADH and Glutamate On-Line Sensors using Os-Gel-HRP/GC Electrodes Modified with NADH Oxidase and Glutamate Dehydrogenase*, *Biosensors & Bioelectronics*, **1999**, 14 (7): 631-638.
96. Nakabayashi, Y., Omayu, A., Morii, S. und Yagi, S., *Evaluation of Osmium(II) Complexes as Mediators Accessible for Biosensors*, *Sensors and Actuators B*, **2000**, 66 (1-3): 128-130.
97. Kane, S.A., Iwuoba, E.I. und Smyth, M.R., *Development of a Sol-Gel Based Amperometric Biosensor for the Determination of Phenolics*, *Analyst*, **1998**, 123 (10): 2001-2006.
98. Neumann, B., Wollenberger, U., Becher, G., Scheller, F. und Wilson, G. *HRP Biosensors For Peroxide Detection in Unconventional Media*, in *The Fifth World Congress on Biosensors*, **1998**, Berlin, Germany: Elsevier Science.
99. Lindgren, A., Tanaka, M., Ruzgas, T., Gorton, L., Gazaryan, I., Ishimori, K. und Morishima, I., *Direct Electron Transfer Catalysed by Recombinant Forms of Horseradish Peroxidase: Insight into the Mechanism*, *Electrochemistry Communications*, **1999**, 1 (5): 171-175.
100. Presnova, G., Grigorenko, V., Egorov, A., Ruzgas, T., Lindgren, A., Gorton, L. und Borchers, T., *Direct Heterogeneous Electron Transfer of Recombinant Horseradish Peroxidases on Gold*, *Faraday Discussions*, **2000** (116): 281-289.
101. Ferapontova, E., Schmengler, K., Borchers, T., Ruzgas, T. und Gorton, L., *Effect of Cysteine Mutations on Direct Electron Transfer of Horseradish Peroxidase on Gold*, *Biosensors & Bioelectronics*, **2002**, 17 (11-12): 953-963.
102. Lindgren, A., Ruzgas, T., Gorton, L., Csoregi, E., Ardila, G.B., Sakharov, I.Y. und Gazaryan, I.G., *Biosensors Based on Novel Peroxidases with Improved Properties in Direct and Mediated Electron Transfer*, *Biosensors & Bioelectronics*, **2000**, 15 (9-10): 491-497.
103. Yaropolov, A.I., Tarasevich, M.R. und Varfolomeev, S.D., *Electrochemical Properties of Peroxidase*, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **1978**, 5 (1): 18-24.
104. Bogdanovskaya, V.A., Tarasevich, M.R., Hintsche, R. und Scheller, F., *Electrochemical Transformations of Proteins Adsorbed at Carbon Electrodes*, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **1988**, 19 (3): 581-584.
105. Durliat, H., Courteix, A. und Comtat, M., *Reactions of Horseradish Peroxidase on a Platinum Cathode*, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **1989**, 22: 197-209.
106. Comtat, M. und Durliat, H., *Some Examples of the Use of Thin-Layer Spectroelectrochemistry in the Study of Electron-Transfer between Metals and Enzymes*, *Biosensors & Bioelectronics*, **1994**, 9 (9-10): 663-668.

107. Gorton, L., Jönsson-Pettersson, G., Csöregi, E., Johansson, K., Dominguez, E. und Marko-Varga, G., *Amperometric Biosensors Based on an Apparent Direct Electron Transfer Between Electrodes and Immobilized Peroxidases*, *Analyst*, **1992**, 117 (8): 1235-1241.
108. Gorton, L., Csoregi, E., Dominguez, E., Emneus, J., Jonsson-Pettersson, G., Marko-Varga, G. und Persson, B., *Selective Detection in Flow Analysis Based on the Combination of Immobilized Enzymes and Chemically Modified Electrodes*, *Analytica Chimica Acta*, **1991**, 250: 203-248.
109. Andreescu, D., Andreescu, S. und Sadik, O.A., *New Materials for Biosensors, Biochips and Molecular Bioelectronics*, in *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques*, Hrg.: Gorton, L., **2005**, Elsevier, Amsterdam: 285-327.
110. Popescu, I.C., Zetterberg, G. und Gorton, L., *Influence of Graphite Powder, Additives and Enzyme Immobilization Procedures on a Mediatorless HRP-Modified Carbon-Paste Electrode for Amperometric Flow-Injection Detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*, *Biosensors & Bioelectronics*, **1995**, 10 (5): 443-461.
111. Vasudevan, P., Mann, S.N. und Tyagi, S., *Transition Metal Complexes of Porphyrins and Phthalocyanines as Electrocatalysts for Dioxygen Reduction*, *Transition Metal Chemistry*, **1990**, 15 (2): 81-90.
112. Bogdanoff, P., Herrmann, I., Hilgendorff, M., Dorbandt, I., Fiechter, S. und Tributsch, H., *Probing Structural Effects of Pyrolysed CoTMPP-based Electrocatalysts for Oxygen Reduction via New Preparation Strategies*, *Journal of New Materials for Electrochemical Systems*, **2004**, 7: 85-92.
113. Herrmann, I., Brüser, V., Fiechter, S., Kersten, H. und Bogdanoff, P., *Electrocatalysts for Oxygen Reduction Prepared by Plasma Treatment of Carbon-Supported Cobalt Tetramethoxyphenylporphyrin*, *Journal of the Electrochemical Society*, **2005**, 152 (11): A2179.
114. van Veen, J.A.R., Colijn, H.A. und van Baar, J.F., *On the Effect of a Heat Treatment on the Structure of Carbon-Supported Metalloporphyrins and Phthalocyanines*, *Electrochimica Acta*, **1988**, 33 (6): 801-804.
115. Scherson, D., Tanaka, A.A., Gupta, S.L., Tryk, D., Fierro, C., Holze, R., Yeager, E.B. und Lattimer, R.P., *Transition-Metal Macrocycles Supported on High Area Carbon - Pyrolysis Mass-Spectrometry Studies*, *Electrochimica Acta*, **1986**, 31 (10): 1247-1258.
116. Gamburgzev, S., Atanasov, P., Ghindilis, A.L., Wilkins, E., Kaisheva, A. und Iliev, I., *Bifunctional Hydrogen Peroxide Electrode as an Amperometric Transducer for Biosensors*, *Sensors and Actuators B*, **1997**, 43 (1-3): 70-77.

117. Gamburgzev, S., Atanasov, P. und Wilkins, E., *Oxygen Electrode with Pyrolyzed CoTMPP Catalyst: Application in Glucose Biosensor*, Analytical Letters, **1997**, 30 (3): 503-514.
118. Gamburgzev, S., Iliev, I., Atanasov, P., Kaisheva, A., Scheller, F. und Pfeifer, D., *Enzyme Electrodes with Pyrolyzed CoTMPP Catalyst*, Electroanalysis, **1991**, 3 (8): 865-867.
119. Atanasov, P., Gamburgzev, S. und Wilkins, E., *Needle-Type Glucose Biosensors Based on a Pyrolyzed Cobalt-Tetramethoxy-Phenylporphyrin Catalytic Electrode*, Electroanalysis, **1996**, 8 (2): 158-164.
120. Buchler, J.W., *Osmium and Cerium Porphyrins: Metalloporphyrins with Unnatural Metals as Models for Active Sites of Electron-Transfer Enzymes*, Comments on Inorganic Chemistry, **1987**, 6 (4): 175 - 191.
121. Paulson, D.R., Addison, A.W., Dolphin, D. und James, B.R., *Preparation of Ruthenium(II) and Ruthenium(III) Myoglobin and the Reaction of Dioxygen, and Carbon Monoxide, with Ruthenium(II) Myoglobin*, Journal of Biological Chemistry, **1979**, 254 (15): 7002-7006.
122. Srivastava, T.S., *A Carbon Monoxide Derivative of Ruthenium (II) Myoglobin Probe of Heme Protein Conformation*, Biochimica et Biophysica Acta, **1977**, 491 (2): 599-604.
123. Che, C.-M., Chiang, H.-J., Margalit, R. und Gray, H.B., *Preparation and Properties of Osmoglobins. Oxidation-Reduction Catalytic Activity of Ruthenated Osmoglobin*, Catalysis Letters, **1988**, 1 (1): 51-54.
124. Khan, K.K., Mondal, M.S. und Mitra, S., *Kinetic Studies of the Reaction of Hydrogen Peroxide with Manganese-Reconstituted Horseradish Peroxidase*, Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions, **1996** (6): 1059-1062.
125. Khan, K.K., Mondal, M.S. und Mitra, S., *Kinetics and Thermodynamics of the Reaction of Peroxides with Manganese-Reconstituted Horseradish Peroxidase: a Stopped-Flow Transient Kinetic Investigation*, Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions, **1998** (4): 533-536.
126. Modi, S., Saxena, A.K., Behere, D.V. und Mitra, S., *Binding of Thiocyanate and Cyanide to Manganese(III)-Reconstituted Horseradish-Peroxidase - a <sup>15</sup>N Nuclear-Magnetic-Resonance Study*, Biochimica et Biophysica Acta, **1990**, 1038 (2): 164-171.
127. Nick, R.J., Ray, G.B., Fish, K.M., Spiro, T.G. und Groves, J.T., *Evidence for a Weak Mn=O Bond and a Non-Porphyrin Radical in Manganese-Substituted Horseradish Peroxidase Compound I*, Journal of the American Chemical Society, **1991**, 113: 1838-1840.



128. Ray, G.B., Spiro, T.G. und Su, Y.O., *Comparison of the Coordination Environment of Mn(III) and Mn(IV) Horseradish-Peroxidase with Manganese - Porphyrin Model Compounds*, Abstracts of Papers of the American Chemical Society, **1991**, 202: 95.
129. Saxena, A., Modi, S., Behere, D.V. und Mitra, S., *Interaction of Aromatic Donor Molecules with Manganese(III) Reconstituted Horseradish-Peroxidase - Proton Nuclear-Magnetic-Resonance and Optical-Difference Spectroscopic Studies*, Biochimica et Biophysica Acta, **1990**, 1041 (1): 83-93.
130. Yonetani, T. und Asakura, T., *Studies on Cytochrome c Peroxidase. XV. Comparison of Manganese Porphyrin-Containing Cytochrome c Peroxidase, Horseradish Peroxidase, and Myoglobin*, Journal of Biological Chemistry, **1969**, 244 (17): 4580-4588.
131. Yonetani, T. und Erman, J.E., *Comparison of Peroxide Compounds of Iron and Manganese Porphyrin-Containing Cytochrome C Peroxidase (Ccp) and Horseradish Peroxidase (Hrp)*, Federation Proceedings, **1970**, 29 (2): A732.
132. Hori, H., Ikedasaito, M. und Yonetani, T., *Electron-Paramagnetic Resonance and Spectrophotometric Studies of the Peroxide Compounds of Manganese-Substituted Horseradish-Peroxidase, Cytochrome-C Peroxidase and Manganese-Porphyrin Model Complexes*, Biochimica et Biophysica Acta, **1987**, 912 (1): 74-81.
133. Atassi, M.Z., *Immunochemistry of Sperm-Whale Myoglobins Prepared with Various Modified Porphyrins and Metalloporphyrins*, Biochemical Journal, **1967**, 103: 29-35.
134. Lin, R., Immoos, C.E. und Farmer, P.J., *Unusual Voltammetry of Manganese-Substituted Myoglobin in Surfactant Film: Evidence for Two Redox Pathways*, Journal of Biological Inorganic Chemistry, **2000**, 5 (6): 738-747.
135. Mondal, M.S., Mazumdar, S. und Mitra, S., *Binding of Cyanide and Thiocyanate to Manganese Reconstituted Myoglobin and Formation of Peroxide Compound - Optical Spectral, Multinuclear NMR, and Kinetic-Studies*, Inorganic Chemistry, **1993**, 32 (23): 5362-5367.
136. Mondal, M.S. und Mitra, S., *Kinetic Studies of the Two-Step Reactions of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with Manganese-Reconstituted Myoglobin*, Biochimica et Biophysica Acta, **1996**, 1296 (2): 174-180.
137. Taniguchi, I., Li, C.-z., Ishida, M. und Yao, Q., *Electrochemical and Spectroelectrochemical Properties of Manganese Reconstituted Myoglobin*, Journal of Electroanalytical Chemistry, **1999**, 460: 245-250.
138. Aronoff, D.M., Boutaud, O., Marnett, L.J. und Oates, J.A., *Inhibition of Prostaglandin H<sub>2</sub> Synthases by Salicylate is Dependent on the Oxidative State of the Enzymes*, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **2003**, 304 (2): 589-595.

139. Gupta, K., Selinsky, B.S. und Loll, P.J., *2.0 Å Structure of Prostaglandin H<sub>2</sub> Synthase-1 Reconstituted with a Manganese Porphyrin Cofactor*, Acta Crystallographica Section D, **2006**, 62: 151-156.
140. Kulmacz, R.J., Palmer, G., Wei, C.H. und Tsai, A.L., *Reaction and Free-Radical Kinetics of Prostaglandin-H Synthase with Manganese Protoporphyrin-IX as the Prosthetic Group*, Biochemistry, **1994**, 33 (18): 5428-5439.
141. Landino, L.M. und Marnett, L.J., *Mechanism of Hydroperoxide Reduction by Manganese Prostaglandin Endoperoxide Synthase*, Biochemistry, **1996**, 35 (8): 2637-2643.
142. Strieder, S., Schaible, K., Scherer, H.-J., Dietz, R. und Ruf, H.H., *Prostaglandin Endoperoxide Synthase Substituted with Manganese Protoporphyrin IX*, Journal of Biological Chemistry, **1992**, 267 (20): 13870-13878.
143. Yonetani, T. und Asakura, T., *Studies on Cytochrome c Peroxidase .XI. A Crystalline Enzyme Reconstituted from apoEnzyme and Manganese Protoporphyrin IX*, Journal of Biological Chemistry, **1968**, 243 (14): 3996-3998.
144. Fabry, T.L., Simo, C. und Javaherian, K., *Preparation of Mesoporphyrin IX and Copper and Manganese Mesoporphyrin Complexes of apoHemoglobin*, Biochimica et Biophysica Acta, **1968**, 160: 118-122.
145. Gruenke, L.D., Sun, J., Loehr, T.M. und Waskell, L., *Resonance Raman Spectral Properties and Stability of Manganese Protoporphyrin IX Cytochrome b<sub>5</sub>*, Biochemistry, **1997**, 36 (23): 7114-7125.
146. Dierks, E.A., Hu, S., Vogel, K.M., Yu, A.E., Spiro, T.G. und Burstyn, J.N., *Demonstration of the Role of Scission of the Proximal Histidine-Iron Bond in the Activation of Soluble Guanylyl Cyclase through Metalloporphyrin Substitution Studies*, Journal of the American Chemical Society, **1997**, 119: 7316-7323.
147. Primus, J.-L., Boersma, M.G., Mandon, D., Boeren, S., Veeger, C., Weiss, R. und Rietjens, I.M.C.M., *The Effect of Iron to Manganese Substitution on Microperoxidase 8 Catalysed Peroxidase and Cytochrome P450 Type of Catalysis*, Journal of Biological Inorganic Chemistry, **1999**, 4: 274-283.
148. Hoffman, B.M. und Petering, D.H., *Coboglobins: Oxygen-Carrying Cobalt-Reconstituted Hemoglobin and Myoglobin*, Proceedings of the National Academy of Sciences, **1970**, 67 (2): 637-643.
149. Basolo, F., Hoffman, B.M. und Ibers, J.A., *Synthetic Oxygen Carriers of Biological Interest*, Accounts of Chemical Research, **1975**, 8 (11): 384-392.
150. Dickinson, L.C. und Chien, J.C.W., *Comparative Biological Chemistry of Cobalt Hemoglobin*, Journal of Biological Chemistry, **1973**, 248 (14): 5005-5011.

151. Dickinson, L.C. und Chien, J.C.W., *Electron Transfer between Hemoglobin and Coboglobin Mediated by Methylene Blue*, Journal of the American Chemical Society, **1975**, 97 (10): 2620-2625.
152. Zahavy, E. und Willner, I., *Photoinduced Electron Transfer in Eosin-Modified Co(II)-Protoporphyrin IX Reconstituted Myoglobin and  $\alpha$ - or  $\beta$ -Hemoglobin Subunits: Photocatalytic Transformations by the Reconstituted Photoenzymes*, Journal of the American Chemical Society, **1996**, 118 (50): 12499-12514.
153. Vernon, D.I. und Brown, S.B., *Formation of Bile Pigments by Coupled Oxidation of Cobalt-Substituted Haemoglobin and Myoglobin*, Biochemical Journal, **1984**, 223 (1): 205-209.
154. Shelnutz, J.A., Alston, K., Ho, J.Y., Yu, N.T., Yamamoto, T. und Rifkind, J.M., *Four- and Five-Coordinate Species in Nickel-Reconstituted Hemoglobin and Myoglobin: Raman Identification of the Nickel-Histidine Stretching Mode*, Biochemistry, **1986**, 25 (3): 620-627.
155. Findsen, E.W., Alston, K., Shelnutz, J.A. und Ondrias, M.R., *Transient Photoligation Behavior of Nickel Protoporphyrin Reconstituted Myoglobin and Hemoglobin*, Journal of the American Chemical Society, **1986**, 108 (14): 4009-4017.
156. Langley, R., Hambright, P., Alston, K. und Neta, P., *Kinetics of the Reduction of Manganese(III) Myoglobin by Dithionite*, Inorganic Chemistry, **1986**, 25 (1): 114-117.
157. Crnogorac, M.M. und Kostic, N.M., *Redox Reactivity and Reorganization Energy of Zinc Cytochrome c Cation Radical*, Inorganic Chemistry, **2000**, 39 (22): 5028-5035.
158. Kim, J.E., Pribisko, M.A., Gray, H.B. und Winkler, J.R., *Zinc-Porphyrin Solvation in Folded and Unfolded States of Zn-Cytochrome c*, Inorganic Chemistry, **2004**, 43: 7953-7960.
159. Pletneva, E.V., Crnogorac, M.M. und Kostic, N.M., *Mimicking Biological Electron Transport in Sol-Gel Glass: Photoinduced Electron Transfer from Zinc Cytochrome c to Plastocyanin or Cytochrome c Mediated by Mobile Inorganic Complexes*, Journal of the American Chemical Society, **2002**, 124: 14342-14354.
160. Vanderkooi, J.M., Adar, F. und Erecinska, M., *Metallocytochromes c: Characterization of Electronic Absorption and Emission Spectra of  $\text{Sn}^{4+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  Cytochromes c*, European Journal of Biochemistry, **1976**, 64: 381-387.
161. Zhou, J.S., Tran, S.T., McLendon, G. und Hoffman, B.M., *Photoinduced Electron Transfer between Cytochrome c Peroxidase (D37K) and Zn-Substituted Cytochrome c: Probing the Two-Domain Binding and Reactivity of the Peroxidase*, Journal of the American Chemical Society, **1997**, 119: 269-277.
162. Ma, J.G., Laberge, M., Song, X.Z., Jentzen, W., Jia, S.L., Zhang, J., Vanderkooi, J.M. und Shelnutz, J.A., *Protein-Induced Changes in Nonplanarity of the Porphyrin in Nickel*

- Cytochrome c Probed by Resonance Raman Spectroscopy*, *Biochemistry*, **1998**, 37 (15): 5118-5128.
163. Dickinson, L.C. und Chien, J.C.W., *Iron Cytochrome c Reversible Cobalt Cytochrome c Electron Exchange*, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **1976**, 172 (SEP3): 32-32.
164. Dickinson, L.C. und Chien, J.C.W., *Model System of Cobalt-Cytochrome c*, *Inorganic Chemistry*, **1976**, 15 (5): 1111-1114.
165. Bellelli, A., Brzezinski, P., Arese, M., Cutruzzola, F., Silvestrini, M.C. und Brunori, M., *Electron Transfer in Zinc-Reconstituted Nitrite Reductase from Pseudomonas Aeruginosa*, *Biochemical Journal*, **1996**, 319: 407-410.
166. Tamura, M., Shimidzu, N. und Hayashi, K., *Vanadium-Substituted Hemoproteins (I)*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1977**, 75 (4): 1029-1036.
167. Kaneko, Y., Tamura, M. und Yamazaki, I., *Formation of Porphyrin  $\pi$  Cation Radical in Zinc-Substituted Horseradish Peroxidase*, *Biochemistry*, **1980**, 19: 5795-5799.
168. Ikeda-Saito, M., Lutz, R.S., Shelley, D.A., McKelvey, E.J., Mattera, R. und Hori, H., *EPR Characterization of the Stereochemistry of the Distal Heme Pocket of the Engineered Human Myoglobin Mutants*, *Journal of Biological Chemistry*, **1991**, 266 (35): 23641-23647.
169. Matsuo, T., Tsuruta, T., Maehara, K., Sato, H., Hisaeda, Y. und Hayashi, T., *Preparation and O<sub>2</sub> Binding Study of Myoglobin having a Cobalt Porphycene*, *Inorganic Chemistry*, **2005**, 44 (25): 9391-9396.
170. Dickinson, L.C., *Metal Replaced Hemoproteins - Review with Introductory Laboratory Preparation of Cobalt-Myoglobin*, *Journal of Chemical Education*, **1976**, 53 (6): 381-385.
171. Li, C.-z., Nishiyama, K. und Taniguchi, I., *Electrochemical and Spectroelectrochemical Studies on Cobalt Myoglobin*, *Electrochimica Acta*, **2000**, 45 (18): 2883-2888.
172. Heleg-Shabtai, V., Katz, E. und Willner, I., *Assembly of Microperoxidase-11 and Co(II)-Protoporphyrin IX Reconstituted Myoglobin Monolayers on Au-Electrodes: Integrated Bioelectrocatalytic Interfaces*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119 (34): 8121-8122.
173. Gao, J. und Rusling, J.F., *Electron Transfer and Electrochemical Catalysis using Cobalt-Reconstituted Myoglobin in a Surfactant Film*, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1998**, 449 (1-2): 1-4.
174. Hambright, P., Lemelle, S., Alston, K., Neta, P., Newball, H.H. und Di Stefano, S., *A Dissociative Mechanism for the Dithionite Reduction of Cobalt(III) Myoglobin*, *Inorganica Chimica Acta*, **1984**, 92 (3): 167-172.
175. Ruzic, I.M., Smith, T.D. und Pilbrow, J.R., *An Electron Spin Resonance Study of the Molecular Oxygen Adducts of the apoMyoglobin Complexes of Cobalt(II)*

- Protoporphyrin IX and Cobalt-(II) 3,10,17,24-Tetrasulphonated Phthalocyanine*, Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions, **1982** (2): 373-380.
176. Wang, M.-Y.R., Hoffman, B.M., Shire, S.J. und Gurd, F.R.N., *Oxygen Binding to Myoglobins and their Cobalt Analogs*, Journal of the American Chemical Society, **1979**, 101 (24): 7394-7397.
177. Chien, J.C.W. und Dickinson, L.C., *Electron Paramagnetic Resonance of Single Crystal Oxycoaltmyoglobin and Deoxycobaltmyoglobin*, Proceedings of the National Academy of Sciences, **1972**, 69 (10): 2783-2787.
178. Hayashi, T. und Hisaeda, Y., *New Functionalization of Myoglobin by Chemical Modification of Heme-Propionates*, Accounts of Chemical Research, **2002**, 35 (1): 35-43.
179. Hayashi, T., Hitomi, Y., Takimura, T., Tomokuni, A., Mizutani, T., Hisaeda, Y. und Ogoshi, H., *New Approach to the Construction of an Artificial Hemoprotein Complex*, Coordination Chemistry Reviews, **1999**, 192: 961-974.
180. Nishiyama, K., Uchiyama, M., Mie, Y. und Taniguchi, I., *Photochemical Reduction of NADP<sup>+</sup> by Zinc Protoporphyrin Reconstituted Myoglobin as a Simple Model of Photosystem I*, Chemistry Letters, **1999** (4): 357-358.
181. Horrocks, W.D., Venteicher, R.F., Spilburg, C.A. und Vallee, B.L., *Lanthanide Porphyrin Probes of Heme Proteins. Insertion of Ytterbium(III)mesoporphyrin IX into apoMyoglobin*, Biochemical and Biophysical Research Communications, **1975**, 64 (1): 317-322.
182. Margalit, R., Pecht, I. und Gray, H.B., *Oxidation-Reduction Catalytic Activity of a Pentaammineruthenium(III) Derivative of Sperm Whale Myoglobin*, Journal of the American Chemical Society, **1983**, 105 (2): 301-302.
183. Billecke, J., Kokisch, W. und Buchler, J.W., *Osmochromes (Osmium Analogs of Hemochromes) - Proof of Superoxide and Hydroperoxide Generation from Dioxygen and a Metalloporphyrin Lacking a Free Coordination Site*, Journal of the American Chemical Society, **1980**, 102 (10): 3622-3624.
184. Buchler, J.W. und Kokisch, W., *Axial unsymmetrische Osmium(II)-porphyrine mit Schwefel- und Stickstoff-Donoren als Cytochrom-c-Modelle*, Angewandte Chemie, **1981**, 93 (4): 418-420.
185. Buchler, J.W. und Rohbock, K., *Metallkomplexe mit Tetrapyrrol-Liganden. IX. Octaäthylporphyrinato-Osmium(II)-Carbonyl-Komplexe mit trans-ständigen Donator-Liganden*, Journal of Organometallic Chemistry, **1974**, 65: 223 - 234.
186. Buchler, J.W. und Smith, P.D., *Octaethylporphyrinatodioxoosmium(VI) - Extreme Metal Oxidation-State within a Porphin System*, Angewandte Chemie International Edition in English, **1974**, 13 (5): 341-341.

187. Che, C.M., Poon, C.K., Chung, W.C. und Gray, H.B., *Synthesis and Characterization of Osmium Porphyrins*, Inorganic Chemistry, **1985**, 24 (8): 1277-1278.
188. Brown, G.M., Hopf, F.R., Meyer, T.J. und Whitten, D.G., *Effect of Extraplanar Ligands on the Redox Properties and the Site of Oxidation in Iron, Ruthenium, and Osmium Porphyrin Complexes*, Journal of the American Chemical Society, **1975**, 97 (19): 5385-5390.
189. Buchler, J.W. und Künzel, F.M., *Metallkomplexe mit Tetrapyrrol-Liganden. 68. Synthese wasserlöslicher Osmium-Porphyrin-Komplexe*, Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie, **1994**, 620 (5): 888-897.
190. Buchler, J.W., *Hemoglobin - An Inspiration for Research In Coordination Chemistry*, Angewandte Chemie International Edition in English, **1978**, 17 (6): 407-423.
191. Mashiko, T., Marchon, J.C., Musser, D.T., Reed, C.A., Kastner, M.E. und Scheidt, W.R., *Cytochrome c Models*, Journal of the American Chemical Society, **1979**, 101 (13): 3653-3655.
192. Che, C.M., Leung, W.H. und Chung, W.C., *Novel Osmium(IV) and -(V) Porphyrins. Synthesis, Spectroscopy, and Electrochemistry*, Inorganic Chemistry, **1990**, 29 (10): 1841-1846.
193. Che, C.M. und Chung, W.C., *Catalyzed Epoxidation and Hydroxylation of Alkene by Osmium(III)-Porphyrin Complexes*, Journal of the Chemical Society-Chemical Communications, **1986** (5): 386-388.
194. Bergmeyer, *Methods of Enzymatic Analysis*, 3. Aufl., Bd. VII (Metabolites 2), **1989**, Wiley-VCH, Weinheim.
195. Teale, F.W.J., *Cleavage of the Haem-Protein Link by Acid Methylethylketone*, Biochimica et Biophysica Acta, **1959**, 35 (2): 543-543.
196. Bradford, M.M., *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*, Analytical Biochemistry, **1976**, 72 (1-2): 248-254.
197. Kellum, J., Kramer, D., Lee, K., Mankad, S., Bellomo, R. und Pinsky, M., *Release of Lactate by the Lung in Acute Lung Injury*, Chest, **1997**, 111 (5): 1301-1305.
198. Becher, G., Rothe, M. und Decker, M., *Exhaled Breath Condensate (EBC): An Alternative or Additional Diagnostic?*, in *Breath Analysis For Clinical Diagnosis And Therapeutic Monitoring*, Hrg.: Amann, A. und Smith, D., **2005**, World Scientific Publishing, Singapore: 421-428.
199. Schleiss, M., Holz, O., Behnke, M., Richter, K., Magnussen, H. und Jörres, R., *The Concentration of Hydrogen Peroxide in Exhaled Air Depends on Expiratory Flow Rate*, European Respiratory Journal, **2000**, 16 (6): 1115-1118.

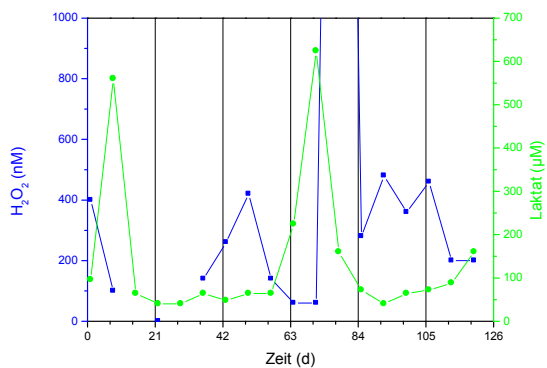
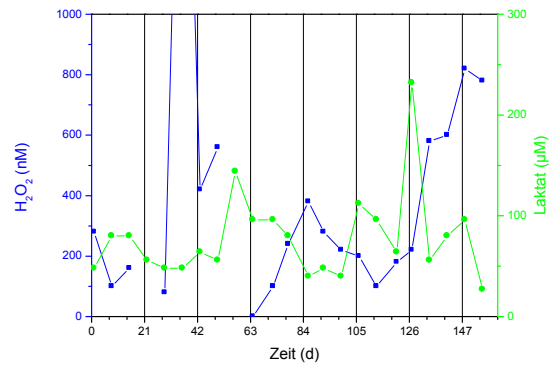
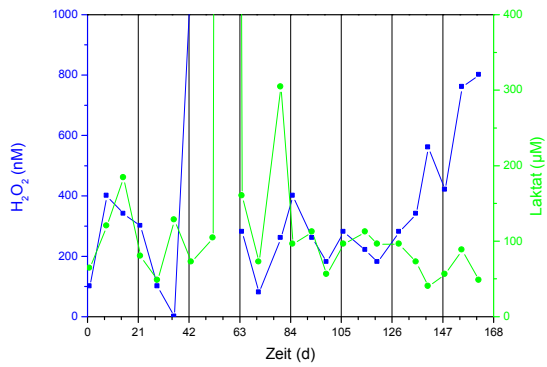
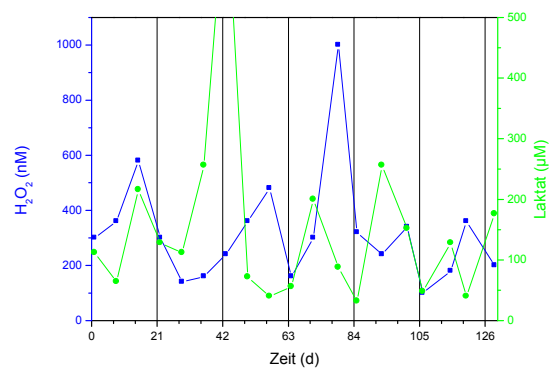
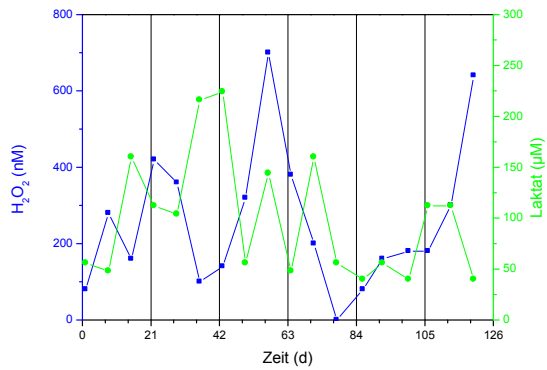
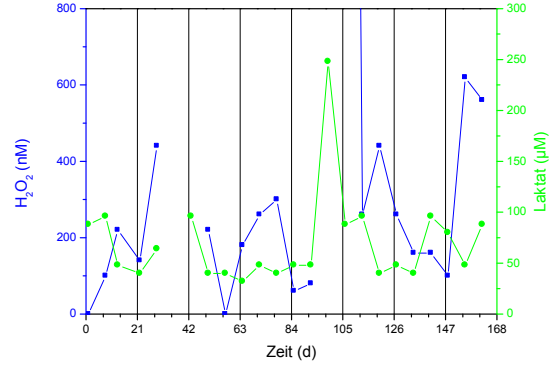
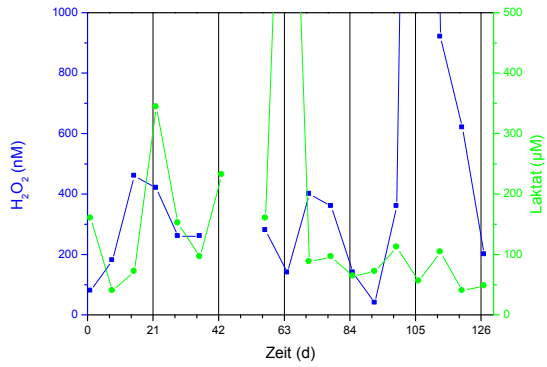
200. Smith, E.W., Skelton, M.S., Kremer, D.E., Pascoe, D.D. und Gladden, L.B., *Lactate Distribution in the Blood During Progressive Exercise*, *Medicine & Science in Sports & Exercise*, **1997**, 29 (5): 654-660.
201. Johnson, R.E., Edwards, H.T., Dill, D.B. und Wilson, J.W., *Blood as a Physicochemical System. XIII. The Distribution of Lactate*, *Journal of Biological Chemistry*, **1945**, 157 (2): 461-473.
202. Foxdal, P., Sjödin, B., Rudstam, H., Östman, C., Östman, B. und Hedenstierna, G.C., *Lactate Concentration Differences in Plasma, Whole Blood, Capillary Finger Blood and Erythrocytes during Submaximal Graded Exercise in Humans*, *European Journal of Applied Physiology*, **1990**, 61 (3): 218-222.
203. Juel, C., *Laktattransport im Skelettmuskel: Trainingsinduzierte Anpassung und Bedeutung bei körperlicher Belastung*, *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, **2004** (6): 157-160.
204. Adachi, H., Sakurai, S., Oshima, S. und Taniguchi, K., *Effect of Physical Training on Blood Viscosity during Acute Exercise*, *Japanese Journal of Clinical Physiology*, **2003**, 33 (5): 271-278.
205. Herrmann, I., Hahn-Meitner-Institut, Berlin, persönliche Mitteilung.
206. Jia, N., Martin, R.B., Qi, Z., Lefebvre, M.C. und Pickup, P.G., *Modification of Carbon Supported Catalysts to Improve Performance in Gas Diffusion Electrodes*, *Electrochimica Acta*, **2001**, 46 (18): 2863-2869.
207. Ruzgas, T., Gorton, L., Emneus, J. und Markovarga, G., *Kinetic-Models of Horseradish-Peroxidase Action on a Graphite Electrode*, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1995**, 391 (1-2): 41-49.
208. Bard, A.J. und Faulkner, L.R., *Electrochemical Methods*, **1980**, John Wiley & Sons, New York.
209. Ferapontova, E. und Gorton, L., *Effect of pH on Direct Electron Transfer in the System Gold Electrode-Recombinant Horseradish Peroxidase*, *Bioelectrochemistry*, **2002**, 55 (1-2): 83-87.
210. Mosseri, S., Neta, P., Hambright, P., Sabry, D.Y. und Harriman, A., *Redox Reactions of Osmium Porphyrins*, *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions*, **1988**: 2705 - 2711.
211. Leung, W.H., Hun, T.S.W., Wong, K.Y. und Wong, W.T., *Synthesis and Electrochemistry of Dialkylosmium-(IV) and Dialkylosmium-(V) Porphyrins - Crystal-Structure of [Os(ttp)(Ch<sub>2</sub>SiMe<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] [H<sub>2</sub>ttp=5,10,15,20-Tetra(P-Tolyl)Porphyrin]*, *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions*, **1994** (18): 2713-2718.

212. Dolman, D., Newell, G.A. und Thurlow, M.D., *A kinetic Study of the Reaction of Horseradish Peroxidase with Hydrogen Peroxide*, Canadian Journal of Biochemistry, **1975**, 53 (5): 495-501.
213. Brill, A.S., *Peroxidases and Catalase*, in *Comprehensive Biochemistry*, Hrg.: Florkin, M. und Stotz, E.H., **1966**, Elsevier, Amsterdam: 447-479.
214. Rusling, J.F. und Nassar, A.E.F., *Enhanced Electron Transfer for Myoglobin in Surfactant Films on Electrodes*, Journal of the American Chemical Society, **1993**, 115 (25): 11891-11897.
215. Nassar, A.-E.F., Bobbitt, J.M., Stuart, J.D. und Rusling, J.F., *Catalytic Reduction of Organohalide Pollutants by Myoglobin in a Biomembrane-like Surfactant Film*, Journal of the American Chemical Society, **1995**, 117 (44): 10986-10993.
216. Tang, J., Wang, B., Wu, Z., Han, X., Dong, S. und Wang, E., *Lipid Membrane Immobilized Horseradish Peroxidase Biosensor for Amperometric Determination of Hydrogen Peroxide*, Biosensors & Bioelectronics, **2003**, 18: 867-872.
217. Chen, X., Peng, X., Kong, J. und Deng, J., *Facilitated Electron Transfer from an Electrode to Horseradish Peroxidase in a Biomembrane-Like Surfactant Film*, Journal of Electroanalytical Chemistry, **2000**, 480: 26-33.
218. Wiwatchaiwong, S., Matsumura, H., Nakamura, N., Yohda, M. und Ohno, H., *Spectroscopic and Electrochemical Characterization of Cytochrome P450st-DDAB Films on a Plastic-Formed Carbon Electrode*, Electroanalysis, **2007**, 19 (5): 561-565.
219. Yang, P., Zhao, Q., Gu, Z. und Zhuang, Q., *The Electrochemical Behavior of Hemoglobin on SWNTs/DDAB Film Modified Glassy Carbon Electrode*, Electroanalysis, **2004**, 16 (1-2): 97-100.
220. Ferri, T., Poscia, A. und Santucci, R., *Direct Electrochemistry of Membrane-Entrapped Horseradish Peroxidase. Part I. A Voltammetric and Spectroscopic Study*, Bioelectrochemistry and Bioenergetics, **1998**, 44 (2): 177-181.
221. Rutter, R., Valentine, M., Hendrich, M.P., Hager, L.P. und Debrunner, P.G., *Chemical Nature of the Porphyrin  $\pi$  Cation Radical in Horseradish Peroxidase Compound I*, Biochemistry, **1983**, 22 (20): 4769-4774.

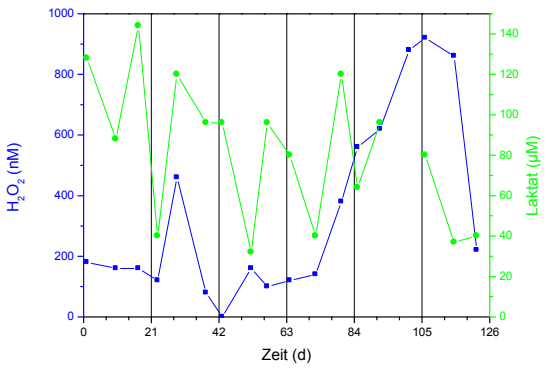
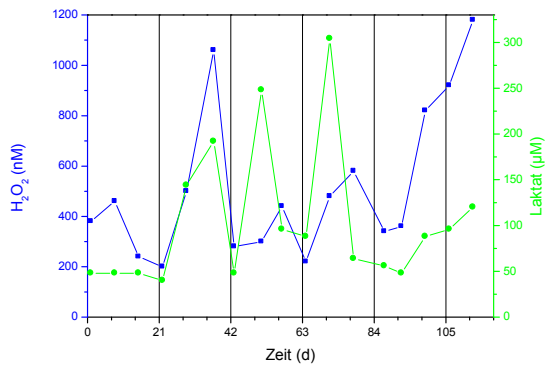
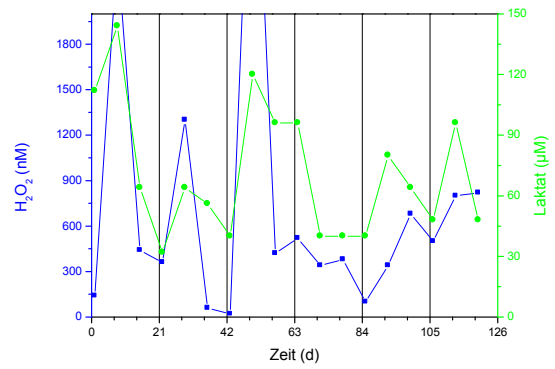
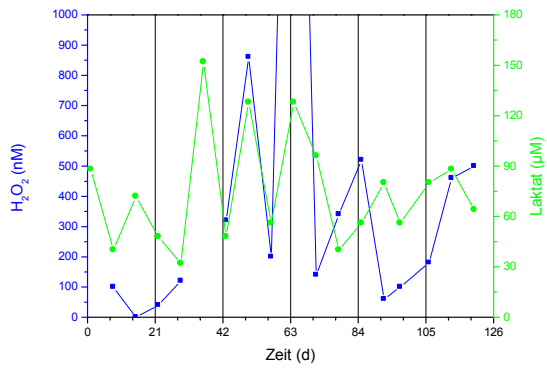
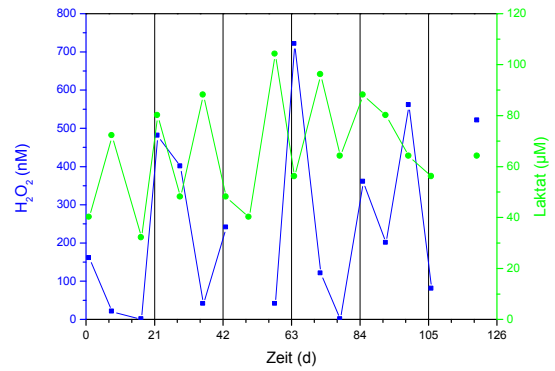
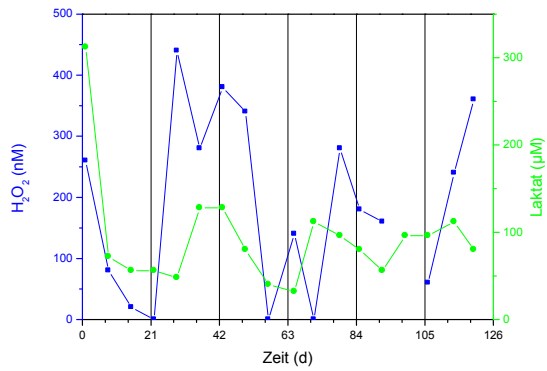


**Anhang**

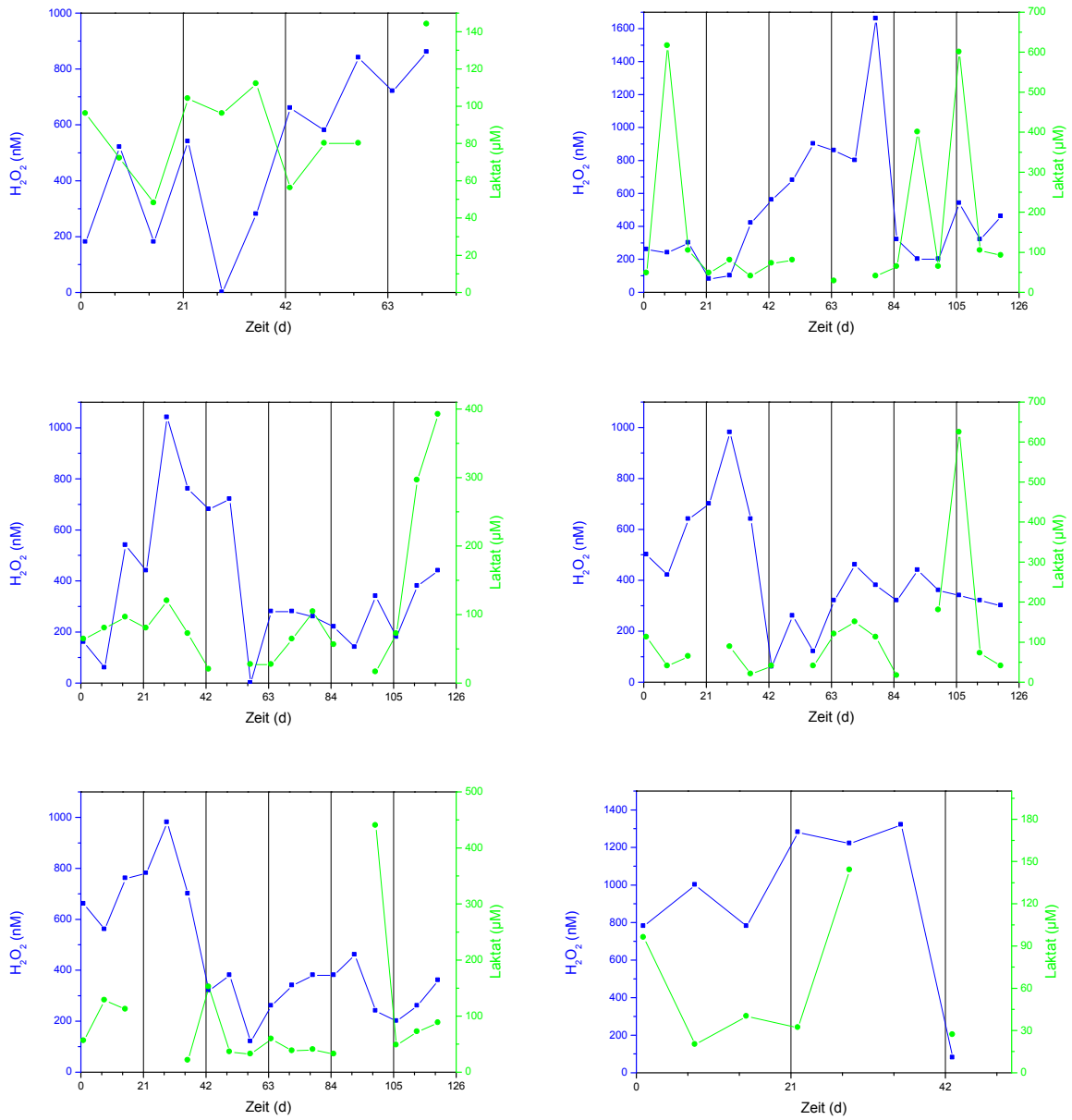
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und Laktat-Konzentrationen im EBC bei den 19 Brustkrebs-Patientinnen, vertikale Linien zeigen den Beginn eines neuen Chemotherapie-Zyklus.**



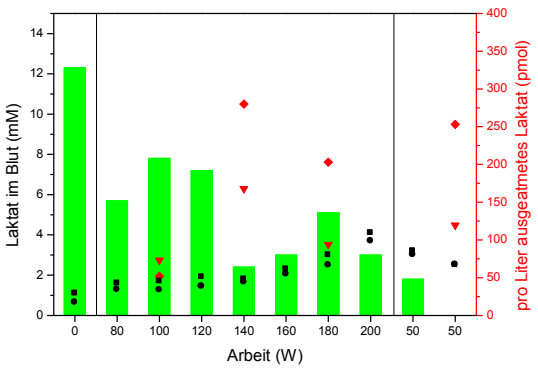
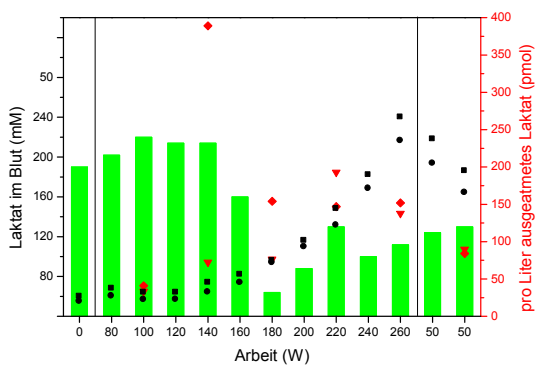
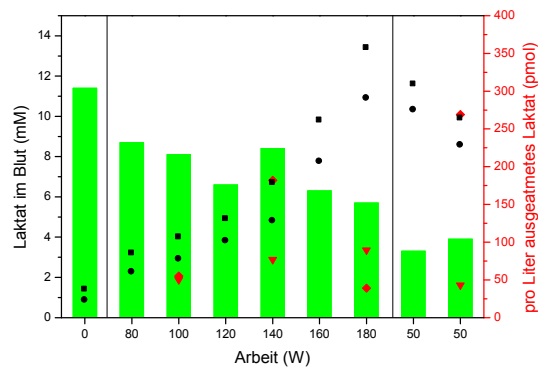
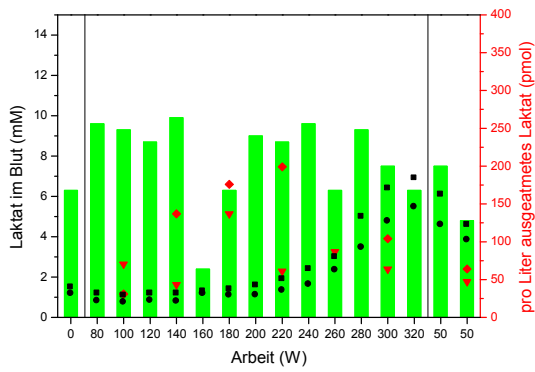
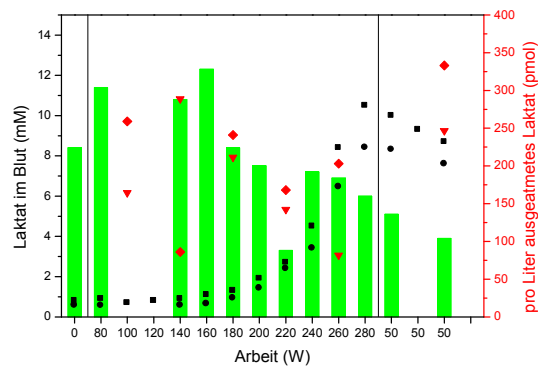
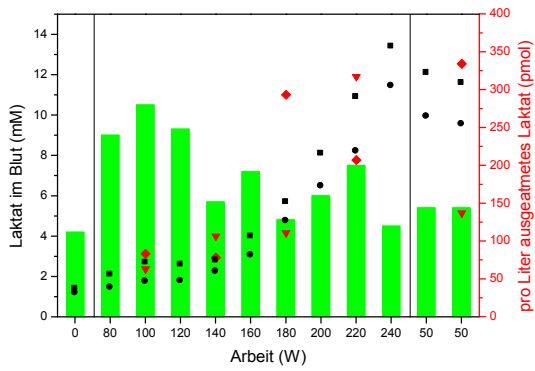
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und Laktat-Konzentrationen im EBC bei den 19 Brustkrebs-Patientinnen, vertikale Linien zeigen den Beginn eines neuen Chemotherapie-Zyklus.**



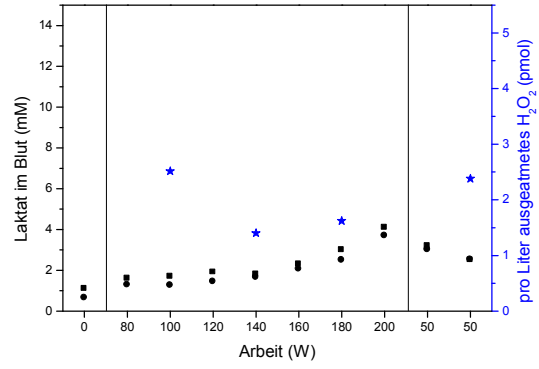
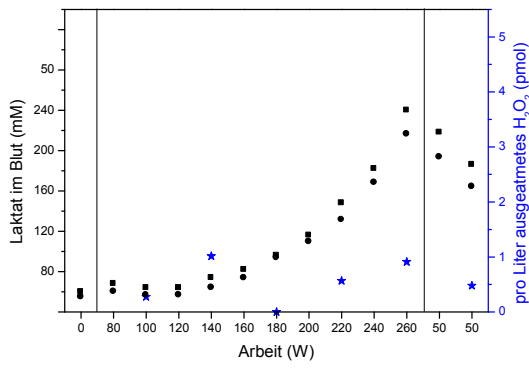
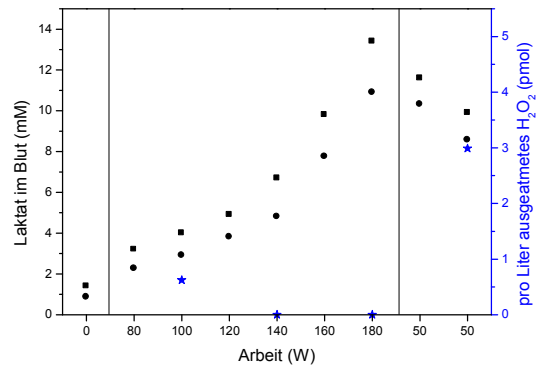
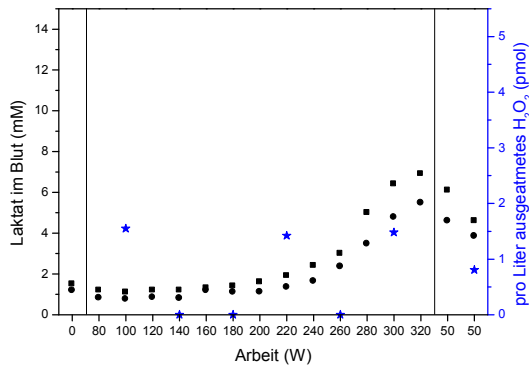
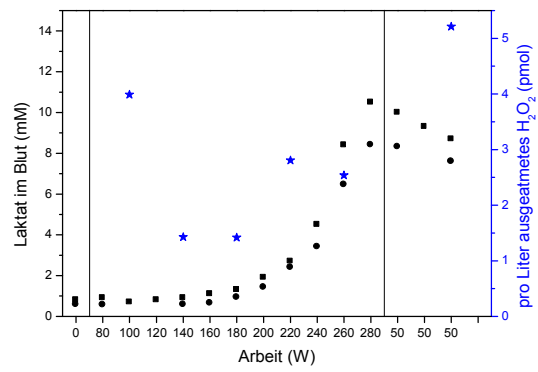
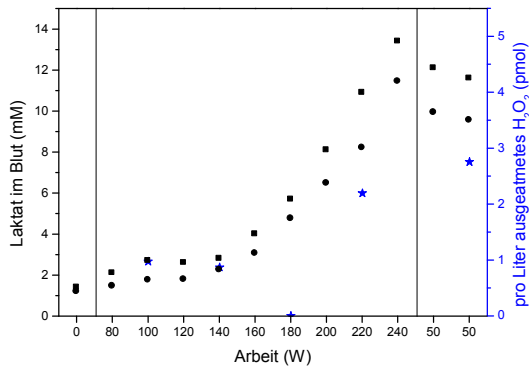
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und Laktat-Konzentrationen im EBC bei den 19 Brustkrebs-Patientinnen, vertikale Linien zeigen den Beginn eines neuen Chemotherapie-Zyklus.**



**Laktat-Konzentrationen im Blut und EBC bei den 6 Ergometer-Probanden mit Unterschied zwischen Vollblut und Hämolystat (obere Grenze = 50 %).**



**Laktat-Konzentrationen im Blut und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration im EBC bei den 6 Ergometer-Probanden.**



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, ohne deren Unterstützung und Motivation ich diese Arbeit nicht zu Ende gebracht hätte.

Allen voran danke ich Prof. Frieder W. Scheller dafür, dass er mir die Möglichkeit gab, in Potsdam zu bleiben. Auch wenn das erste Thema, das er mir stellte, keinerlei wissenschaftliche Ergebnisse brachte, so verdanke ich dem Projekt doch einen Koreaaufenthalt und damit interessante Erfahrungen. Nach einem Themawechsel kamen dann auch interessante wissenschaftliche Ergebnisse dazu.

Martin Katterle und Ulla Wollenberger danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft. Martin war vor allem bei den chemischen Teilen meiner Arbeit eine große Hilfe. Ulla konnte bei den elektrochemischen Messungen immer hilfreiche Anregungen geben.

Andrea Kühn und Angelika Lehman danke ich für die technische Unterstützung, Frau Lehman vor allem auch für ihre Bereitschaft immer wieder Aktivitätstests und Proteinbestimmungen durchzuführen.

Dem Personal des interdisziplinären Brustzentrum (IBZ) der Universitätsklinik Charité in Berlin-Mitte, darunter Klaus-Jürgen Winzer, Heinz-Ulrich Aldinger sowie Monika Dehmel, Daniela Koslowski und alle anderen Krankenschwestern, danke ich dafür, dass sie mich so freundlich aufgenommen und stets zur Seite gestanden haben.

Der FILT GmbH und der BST danke ich für die Bereitstellung der und Einweisung in die Geräte und Nesimi Öner und Jan Szeponik für den kontinuierlichen Nachschub an Verbrauchsmaterialien.

Der Messplan in der Sportmedizin war sehr eng gestrickt und ohne die Mithilfe von Sarah Schwieger, Doris Seipelt und Frank Mayer vom Institut für Sportmedizin und Prävention (Sportmedizin & Sportorthopädie) und Gunther Becher und Manfred Decker von der FILT GmbH nicht zu schaffen.

Den Patientinnen des Brustzentrums, deren Namen aus Rechtsgründen die Charité nicht verlassen darf, danke ich für ihre geduldige Teilnahme an der Studie, bei der sie trotz ihrer Beschwerden bis zum Schluss durchhielten und den Probanden in der Sportmedizin, Carsten Teller, Heiner Bauer, Ullrich Wüllenkemper, Kai Strotmeyer, Sebastian Schlieg und Walter Stöcklein, für ihre Anstrengungen auf dem Fahrradergometer.

Mein Dank gilt Peter Bogdanoff und Iris Herrmann vom Hahn-Meitner-Institut in Berlin dafür, dass sie mir die verschiedenen pyrolysierten CoTMPP-Modifikationen mitsamt den dazugehörigen Daten großzügig zur Verfügung stellten.

Mark Meltendorf danke ich für seine fleißige Herstellung von und Messung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit Paste-Elektroden.

Für die MS-Messungen mit der MALDI-TOF danke ich Sophie Haebel vom Interdisziplinären Zentrum für Massenspektrometrie von Biopolymeren und für die Aufnahme der IR-Spektren Brigitte Hannemann vom Institut für Chemie der Universität Potsdam.

Weiterhin danke ich Simone Terjung für ihre Mitarbeit bei den ersten Versuchen zur Synthese von Os-Porphyrin und Herstellung von OsHRP.

Mein Dank gilt auch allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Analytische Biochemie am Institut für Biochemie und Biologie an der Universität Potsdam für das stets gute Arbeitsklima und die vielfältige Unterstützung.



## Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden in verschiedener Form veröffentlicht.

### Teil A: Medizinische Studien

#### Poster

Loew, N., Katterle, M., Scheller, F. W., Becher, G., Winzer, K.-J., *Pilotstudie zur nicht-invasiven Verlaufskontrolle der Chemotherapie an Brustkrebs-Patientinnen*, 26. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie, **31. August – 2. September 2006**, Dresden.

Senologie – Zeitschrift für Mammadiagnostik und –therapie, **2006**, (3), 156.

#### Poster / Paper

Loew, N., Winzer, K.-J., Becher, G., Schönfuß, D., Falck, T., Uhlrich, G., Katterle, M., Scheller, F.W., *Medical Sensors of the BASUMA Body Sensor Network*, 4th International Workshop on Wearable and Implantable Body Sensor Networks, **26. – 28. März 2007**, Aachen.

IFMBE Proceedings, **2007**, 13, 171-176.

### Teil B: Pyrolysiertes CoTMPP als Elektrodenmaterial

#### Poster

Loew, N., Katterle, M., Bogdanoff, P., Herrmann, I., Scheller, F. W., *Detektion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mittels Biosensoren basierend auf Kohlenstoffmodifikationen*, 4. Deutsches BioSensor Symposium, **13. – 16. März 2005**, Regensburg.

#### Poster

Loew, N., Bogdanoff, P., Herrmann, I., Scheller, F. W., Katterle, M., *Detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with Biosensors based on Modifications of Pyrolysed CoTMPP*, Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM), **18. – 21. September 2005**, Berlin.

#### Paper

Loew, N., Bogdanoff, P., Herrmann, I., Wollenberger, U., Scheller, F. W., Katterle, M., *Influence of Modifications on the Efficiency of Pyrolysed CoTMPP as Electrode Material for Horseradish Peroxidase and the Reduction of Hydrogen Peroxide*, Electroanalysis, **2006**, 18 (23), 2324-2330.

### Teil C: Osmium substituierte Meerrettich Peroxidase

#### Poster

Loew, N., Scheller, F. W., Katterle, M., *Osmium-rekonstituierte Meerrettich-Peroxidase*, 5. Deutsches BioSensor Symposium, **18. – 21. März 2007**, Bochum.

#### Vortrag

Loew, N., *Osmium Reconstituted Horseradish Peroxidase*, Workshop on Bioanalysis, **19. – 20. November 2007**, Luckenwalde.