

**Entwicklung eines amperometrischen  
Biosensors mit Cytochrom P-450-Enzymen des  
Menschen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

Vorgelegt von  
**Shiba Joseph**  
aus Kainady (Indien)

Köln, 2001

Berichtersteller:

Prof. Dr. R. Krämer

Prof. Dr. U. Fuhr

Tag der Disputation: 23.05.2001

## Abstract

Cytochrome P-450 enzymes are heme-containing proteins which catalyze pivotal reactions in the metabolism of drugs and other lipophilic xenobiotics. Therefore, characterisation of xenobiotics as substrates or inhibitors of these enzymes is of particular importance for drug therapy. To this end, a biosensor based on the redox properties of these enzymes could be used to replace existing techniques.

For the development of a biosensor, various immobilization techniques were tested using recombinant human CYP3A4. The adsorption of CYP3A4 was monitored by a quartz crystal microbalance (QCM). Redox and catalytic behavior was examined by cyclic voltammetry (CV), amperometry and the analysis of the products.

Immobilization by means of alternating electrostatic adsorption of polycations and CYP3A4 on gold electrodes proved as the method of choice. The quartz crystal microbalance studies showed a linear film growth. A mass loading of 1400 ng/cm<sup>2</sup> and a thickness of 40 Å per layer was determined for the CYP3A4 film on the electrode. The midpoint potential,  $E_m$ , (mean  $\pm$  absolute error) obtained from CV data was  $98 \pm 5$  mV vs. normal hydrogen electrode (NHE). Integration of the reduction peak showed that 70 % of the immobilized CYP3A4 were electrically active. In presence of the substrate, verapamil, a concentration dependent increase in the reduction current was observed, suggesting catalytic activity. The product analysis for verapamil by means of LC-MS gave a turnover rate of  $98 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg CYP3A4})^{-1}$  and  $82 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg CYP3A4})^{-1}$  for the main metabolites norverapamil and D617, respectively. Furthermore, the product analysis showed an inhibition of metabolite formation by ketoconazol, an inhibitor of CYP3A4, and a contribution of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to the catalytic cycle. Additional studies with other substrates (midazolam, progesterone and quinidine) confirmed the catalytic ability of the CYP3A4 electrode. Apparent  $K_M'$  values for all substrates were two orders of magnitude higher than those values published for microsomal incubations.

The attempt to transfer this immobilization procedure to human CYP2D6 was successful. For CYP2D6 a pair of redox peaks with a midpoint potential at  $-113 \pm 5$  mV vs. NHE was observed. In presence of a substrate, dextromethorphan, a concentration dependent increase in reduction current with a correspondingly high  $K_M'$  value was also found for this enzyme.

Thus, with the present data, it could be shown that the substantial requirements for the development of an amperometric cytochrome P-450 biosensor are fulfilled.

## Zusammenfassung

Cytochrom P-450-Enzyme sind Hämproteine, die zentrale Reaktionen im Metabolismus von Arzneimitteln und anderen lipophilen Fremdstoffen katalysieren. Die Charakterisierung von Fremdstoffen als Substrate oder Inhibitoren dieser Enzyme beim Menschen ist daher für die Arzneimitteltherapie von großer Bedeutung. Dafür bietet sich aufgrund der Redoxeigenschaften dieser Enzyme die Verwendung von amperometrischen Biosensoren als Alternative zu herkömmlichen Methoden an. Zur Entwicklung eines Biosensors wurden zunächst verschiedene Immobilisierungsverfahren mit rekombinantem CYP3A4 des Menschen getestet. Die Adsorption von CYP3A4 wurde mit einer Quarz-Kristall-Mikrowaage (QCM) verfolgt. Die Redoxeigenschaften und das katalytische Verhalten dieser Elektroden wurden mit Cyclovoltammetrie, Amperometrie und Produktanalyse untersucht.

Als Verfahren der Wahl erwies sich die Immobilisierung mittels alternierender elektrostatischer Adsorption von Polykationen und dem Enzym auf Goldelektroden. Die Untersuchungen mit der QCM-Technik zeigten ein lineares Filmwachstum. Es wurde eine mittlere Massenbeladung von  $1400 \text{ ng/cm}^2$  und eine Schichtdicke von  $40 \text{ \AA}$  für CYP3A4 auf der Elektrode ermittelt. Cyclovoltammetrisch wurde für CYP3A4 ein Mittelstufenpotential (Mittelwert  $\pm$  Absoluter Fehler) von  $98 \pm 5 \text{ mV}$  gegen die Normal-Wasserstoff-Elektrode (NHE) bestimmt. Die Integration des Reduktionspeaks zeigte, daß 70% des immobilisierten CYP3A4 elektroaktiv waren. In Gegenwart des Substrats Verapamil zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme des Reduktionsstroms, was auf eine katalytische Aktivität der Elektrode hinweist. Die Produktanalyse für Verapamil mittels LC-MS ergab eine Umsatzrate von  $98 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg CYP3A4})^{-1}$  bzw.  $82 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg CYP3A4})^{-1}$  für die Hauptmetabolite D617 bzw. Norverapamil. Ferner zeigte die Produktanalyse eine Hemmung der Metabolitenbildung in Gegenwart des CYP3A4-Inhibitors Ketoconazol und einen Beitrag von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zum Katalysezyklus. Ergänzende Untersuchungen mit weiteren Substraten (Midazolam, Progesteron und Chinidin) bestätigten die katalytische Fähigkeit des Biosensors. Die scheinbaren  $K_M'$ -Wert übertrafen für alle Substrate die für mikrosomale Inkubationen veröffentlichten Werte um etwa zwei Größenordnungen.

Der Versuch einer Übertragung des Immobilisierungsverfahrens auf das CYP2D6 des Menschen war erfolgreich. Für CYP2D6 konnte ein Redoxpaar mit einem Mittelpunktspotential von  $-113 \pm 5 \text{ mV}$  gegen NHE ermittelt werden. In Gegenwart eines Substrats (Dextromethorphan) wurde auch hier eine konzentrationsabhängige Zunahme des Reduktionsstroms mit einem entsprechend hohen  $K_M'$ -Wert beobachtet.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte damit gezeigt werden, daß die wesentlichen Voraussetzungen für die Entwicklung eines amperometrischen Cytochrom P-450-Biosensors erfüllt sind.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1 Cytochrom P-450	5
1.1.1 Pharmakologische Bedeutung des Cytochrom P-450	6
1.1.2 Charakterisierung der P-450-Enzyme	7
1.2 Ziel der Arbeit	8
<b>2 Theoretischer Teil</b>	<b>9</b>
2.1 Physikalische Eigenschaften der P-450-Enzyme	9
2.1.1 Cytochrom P-450 3A4 (CYP3A4)	10
2.1.1.1 Substrate und spezifische Reaktionen von CYP3A4	10
2.1.2 Cytochrom P-450 2D6 (CYP2D6)	12
2.1.2.1 Substrate und spezifische Reaktionen von CYP2D6	13
2.2 Elektronenübertragung im P-450-System	13
2.3 Reaktionsmechanismus	14
2.4 Biosensoren	15
2.4.1 Arten von Biosensoren	16
2.5 Immobilisierung der Enzyme	17
2.5.1 Strategien und Methoden	18
<b>3 Experimenteller Teil</b>	<b>19</b>
3.1 Material und Methoden	19
3.1.1 Materialien	19
3.1.1.1 Reagenzien und Substanzen	19
3.1.1.2 Immobilisierung	22
3.1.1.3 Geräte	30
3.1.2. Methoden	31
3.1.2.1 Quarz-Kristall-Mikrowaage-Technik	31
3.1.2.2 Elektrochemische Meßmethoden	33
3.1.2.3 Spektroskopie	37
3.2 Experimentelle Durchführung	37
3.2.1 Elektrochemische Untersuchung von CYP3A4 in Lösung	37
3.2.2 Elektrochemische Untersuchung an CYP3A4-beschichteten Elektroden	38
3.2.2.1 Elektroaktivität von Analyten und Reagenzien	38
3.2.2.2 Indirekter Elektronentransfer zu CYP3A4	38
3.2.2.3 Direkter Elektronentransfer zu CYP3A4	39
3.2.2.4 Katalytische Aktivität des CYP3A4	40
3.2.3 Charakterisierung von CYP3A4-Polyion-Filmen	41
3.2.3.1 Filmwachstum	41
3.2.3.2 Spektroskopische und spektroelektrochemische Eigenschaften	41
3.2.3.3 Redoxaktivität	42
3.2.3.4 Einfluß von CO auf die Redoxeigenschaften der CYP3A4-Elektrode	42
3.2.3.5 Einfluß des pH-Wertes auf die Redoxeigenschaften der CYP3A4-Elektrode	42

3.2.3.6 Katalytische Aktivität	43
3.2.3.7 Effekte der Inhibitoren auf die katalytische Aktivität der CYP3A4-Elektrode	43
3.2.3.8 Überprüfung der katalytischen Aktivität durch Elektrolyse	43
3.2.4 Charakterisierung der ablaufenden Reaktionen	44
3.2.4.1 Zeitlicher Verlauf der Metabolitenbildung	44
3.2.4.2 Einfluß des Inhibitors (Ketoconazol) auf die Metabolitenbildung	44
3.2.4.3 Einfluß des Superoxids auf die Metabolitenbildung	44
3.2.4.4 Einfluß des Wasserstoffperoxids auf die Metabolitenbildung	44
3.2.4.5 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung und Sauerstoffverbrauch	45
3.2.5 Ergänzende Untersuchung der katalytischen Eigenschaften der CYP3A4-Elektrode mit weiteren CYP3A4-Substraten	45
3.2.6 Kinetische Parameter	46
3.2.7 Übertragung der Methoden auf CYP2D6	46
3.2.7.1 Cyclovoltammetrie	46
3.2.7.2 SQW-Voltammetrie	47
3.2.7.3 Amperometrie	47
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>48</b>
4.1 Elektrochemische Untersuchung von CYP3A4 in Lösung	48
4.2 Elektrochemische Untersuchung an CYP3A4-beschichteten Elektroden	49
4.2.1 Elektroaktivität von Analyten und Reagenzien	49
4.2.1.1 Cyclovoltammetrie	49
4.2.2 Indirekter Elektronentransfer zu CYP3A4	50
4.2.2.1 Redoxeigenschaften der Mediatoren	50
4.2.2.2. Katalytische Eigenschaften der Mediatoren	52
4.2.3 Direkter Elektronentransfer zu CYP3A4	54
4.2.3.1 Elektroaktivität des CYP3A4	54
4.2.3.2 Katalytische Aktivität des CYP3A4	62
4.3 Charakterisierung von CYP3A4-Polyion-Filmen	64
4.3.1 Filmwachstum	64
4.3.2 Spektroskopische bzw. spektroelektrochemische Untersuchungen	64
4.3.2.1 Spektroskopische Eigenschaften	64
4.3.2.2 Spektroelektrochemische Eigenschaften	65
4.3.3 Redoxaktivität	65
4.3.3.1 Cyclovoltammetrie	65
4.3.3.2 SQW Voltammetrie	67
4.3.4 Einfluß von CO auf die Redoxeigenschaften der CYP3A4-Elektrode	68
4.3.5 Einfluß des pH-Wertes auf die Redoxeigenschaften der CYP3A4-Elektrode	69
4.3.6 Katalytische Aktivität	70
4.3.7 Effekte der Inhibitoren auf die katalytische Aktivität der CYP3A4-Elektrode	71
4.3.7.1 Cyclovoltammetrie	71
4.3.7.2 Amperometrie	72
4.3.8. Überprüfung der katalytischen Aktivität durch Elektrolyse	72
4.4 Charakterisierung der ablaufenden Reaktionen	73
4.4.1 Zeitlicher Verlauf der Metabolitenbildung	73
4.4.2 Einfluß des Inhibitors (Ketoconazol) auf die Metabolitenbildung	74
4.4.3 Einfluß des Superoxids auf die Metabolitenbildung	75

4.4.4 Einfluß des des Wasserstoffperoxids auf die Metabolitenbildung	75
4.4.5 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung und Sauerstoffverbrauch	76
4.5 Ergänzende Untersuchung der katalytischen Eigenschaften der CYP3A4-Elektrode mit weiteren CYP3A4-Substraten	77
4.6 Kinetische Parameter	81
4.6.1 Zusammenstellung der kinetischen Daten	84
4.7 Übertragung der Methoden auf CYP2D6	84
4.6.1 Redoxaktivität	84
4.6.1.1 Cyclovoltammetrie	84
4.6.1.2 SQW-Voltammetrie	85
4.6.2 Katalytische Aktivität	86
<b>5 Diskussion</b>	<b>89</b>
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>104</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>105</b>
<b>8 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>117</b>
<b>9 Tabellenverzeichnis</b>	<b>121</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AE	Arbeitselektrode
BAS	Bio Analytical Systems
BSA	Bovin Serum Albumin
CV	Cyclovoltammetrie
CYP	Cytochrom P-450
D617	2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-Methylamino-2-Isopropylvaleronitril
D620	2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-Amino-2-Isopropylvaleronitril
D702	2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-8-(4-Hydroxy-3-Methoxyphenyl)-6-Methyl-2-Isopropyl-6-Azaoctanitril
D703	2-(4-Hydroxy-3-Methoxyphenyl)-8-(3,4-Dimethoxyphenyl)-6-Methyl-2-Isopropyl-6-Azaoctanitril
DAE	Diaminoethan
DDAB	Didodecyldimethylammoniumbromid
DHP	Dihexadecylphosphat
DLPC	Dilaurylphosphatodylcholin
DMPC	Dimyristoylphosphatodylcholin
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid
E	Spannung
$E_{p,c}$ bzw. $E_{p,a}$	Reduktionspotential bzw. Oxidationspotential
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GA	Glutardialdehyd
GC	Glaskohle
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinol]-Ethansulfonsäure
HS	high spin
I	Strom
$I_{p,c}$ bzw. $I_{p,a}$	Reduktionsstrom bzw. Oxidationsstrom
ITO	Indium tin oxide
LS	low spin
MDZ	Midazolam
MPS	Mercaptopropansulfonsäure
NHE	Normal-Wasserstoff-Elektrode
PDDA	Polydimethyldiallylammoniumchlorid
PATS	Pyridin-3-Carboxaldehyd-Thiocarbazon
PG	pyrrolitischer Graphit
PLL	Polylysin
PSS	Polystyrensulfonsäure
QCM	Quarzkristall-Mikrowaage
SDS	Natriumdodecylsulfat
SQW	Square-Wave



# 1 Einleitung

## 1.1 Cytochrom P-450

Cytochrom P-450 wurde erstmals 1962 von T. Omura und R. Sato erwähnt [Omura et al. 1962]. Seinen Namen erhielt die Enzymsuperfamilie, nachdem G. R. Williams und M. Klingenberg 1958 eine intensive Absorptionsbande bei 450 nm des durch Kohlenmonoxid reduzierten, bis dahin noch weitgehend unbekanntes „Pigments“ beobachteten [Klingenberg 1958]. Diese Enzymgruppe kommt in vielen Lebensformen vom Bakterium bis zum Menschen vor [Omura et al. 1965]. Sie gehört zur Gruppe der Monooxygenasen. Diese katalysieren die Oxidation bzw. Reduktion organischer Substrate durch Sauerstoff und spielen deshalb bei der Biosynthese, beim Stoffwechsel und bei der Entgiftung schädlicher Substanzen, sowie in einigen Fällen bei der Erzeugung hochaktiver Karzinogene eine wesentliche Rolle [Brøsen 1995, Guengerich et al. 1991].

Als Monooxygenasen katalysieren die P-450-Enzyme außer der Hydroxylierung, weitere für den Fremdstoffmetabolismus wichtige Reaktionen, wie z.B. Epoxidierung, Desaminierung, N-, O und S-Desalkylierung oder oxidative Dehalogenierung [Ortiz de Montellano 1995, Testa et al. 1995]. Tabelle 1 zeigt eine kleine Auswahl von Cytochrom P-450-katalysierten Reaktionen mit verschiedenen Substraten.

<b>Reaktion</b>	<b>Substrat</b>
aromatische Hydroxylierung	Lignocain
aliphatische Hydroxylierung	Pentobarbital
Epoxidierung	Benzpyren
Alkohol-Oxidation	Ethanol
O-Desalkylierung	Methoxyresorufin, Ethoxyresorufin
N-Desalkylierung	Diazepam
oxidative Desaminierung	Amphetamin
N-Oxidation	3-Methylpyridin

**Tabelle 1: Beispiel für Reaktionen verschiedener Substrate mit Cytochrom P-450.**

Bis heute sind 215 verschiedene Cytochrom P-450-Familien bekannt [Nelson 2000]. Die Grundstruktur ist jedoch bei allen gleich. Das Molekulargewicht beträgt 45000 Da – 55000 Da und es handelt sich um Hämproteine, die durch ein im Zentrum des

Enzyms lokalisiertes Häm-Molekül als prosthetische Gruppe (sowohl Substrat- als auch Sauerstoff-bindendes Zentrum) charakterisiert sind (Abbildung 1). Basierend auf Aminosäuresequenzen wurde die Einteilung in 215 Enzym-Familien vorgenommen, wovon 67 im Tierreich vorkommen. Die 67 Familien gliedern sich in Subfamilien, von denen 36 im menschlichen Genom kartiert sind [Nelson 2000].

Cytochrom P-450-Enzyme werden der gleichen CYP-Familie zugeordnet, wenn die Aminosäuresequenz zu mehr als etwa 40 % übereinstimmt, innerhalb einer Subfamilie beträgt die Übereinstimmung mehr als etwa 55%. Die der Bezeichnung „CYP“ folgende arabische Ziffer bezeichnet die Familie, der anschließende Großbuchstabe bezeichnet eine Subfamilie. Die einzelnen Enzyme werden chronologisch mit arabischen Ziffern durchnummeriert, z.B. CYP3A4 [Nelson 1996]. Je nach Lokalisierung in der Zelle unterscheidet man zwei verschiedene Typen von Cytochrom P-450 enthaltenden Oxygenase-Systemen: Das in Mitochondrien von tierischem Gewebe und in Bakterien vorkommende System, sowie das unter Eukaryoten weit verbreitete, immer an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) gebundene Oxygenase-System. Das bakterielle Oxygenase-System besteht aus 3 Proteinkomponenten (Cytochrom P-450, Flavoprotein, Eisen-Schwefel-Protein), während das eukaryotische System aus zwei Proteinkomponenten (Cytochrom P-450 und NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase) besteht.

Die Variabilität der Sequenzen dieser Enzymfamilie führt zu unterschiedlichen Eigenschaften der Enzyme, wie z.B. beim Molekulargewicht, bei der Substrat- und Produktspezifität und bei der Sensitivität gegenüber Inhibitoren.

### **1.1.1 Pharmakologische Bedeutung des Cytochrom P-450**

Das Cytochrom P-450 Enzymsystem hat eine zentrale pharmakologische Bedeutung, da eine Vielzahl von Arzneistoffen über diesen Weg metabolisiert werden und deren Wirkung somit in erheblichem Maß von Cytochrom P-450 Enzymen abhängt. Deren Aktivität und damit die pharmakologische Wirkung kann z.B. durch Enzyminduktion oder Inhibition erheblich verändert werden. Durch die gleichzeitige Gabe verschiedener Arzneimittel können verschiedene Cytochrom P-450- Enzyme kompetitiv gehemmt werden, was zu einem verlangsamten Abbau des jeweiligen Arzneimittels und u.U. zu einer toxischen Wirkung führt. Die Induktion eines Cytochrom P-450-Gens wiederum kann einen beschleunigten Metabolismus und dadurch einen Verlust der Wirkung verursachen. Außer durch Hemmung und Induktion wird der mikrosomale Arzneimittelmetabolismus über ein bestimmtes Enzym u.a. durch genetische Polymorphismen, Alter, Nahrung, Lebererkrankungen

und endogene Substanzen beeinflusst. Um Aussagen über die Wirksamkeit und Sicherheit von Arzneistoffen beim Einzelnen treffen zu können, ist also eine genaue Kenntnis des jeweiligen Abbauweges mit den beteiligten Enzymen und des Metabolitenprofils erforderlich. Das Cytochrom P-450-System ist zudem von großem toxikologischen Interesse, da die durch P-450 Katalyse gebildeten reaktiven Metabolite mit RNA, DNA, Proteinen oder Lipiden reagieren und somit zellschädigend wirken können [Ingelman-Sundberg et al. 1982].

Von den mehr als 36 menschlichen Enzymen, die bisher charakterisiert wurden, spielen das CYP3A4, das CYP2D6, das CYP1A2 und das CYP2C19 die bedeutendste Rolle im Arzneimittelmetabolismus.

### **1.1.2 Charakterisierung der P-450-Enzyme**

Aus den genannten Gründen ist bei der Entwicklung von Arzneimitteln, in der Arzneimitteltherapie sowie in der Toxikologie die Charakterisierung von Fremdstoffen als Substrate oder Inhibitoren bestimmter Cytochrom P-450-Enzyme des Menschen von großer Bedeutung. Für die experimentelle Prüfung dieser Eigenschaften werden verschiedene komplexe Systeme in vitro (Leberscheibchen, primäre Hepatozyten in Kultur, mikrosomale Präparationen, isolierte Enzyme, gentechnologisch hergestellte Enzyme) und in vivo (gesunde Versuchspersonen, Patienten) eingesetzt, deren Verfügbarkeit jedoch begrenzt ist bzw. deren Einsatz zu bestimmten Fragestellungen nicht möglich ist [Fuhr et al. 1996, Guengerich 1996]. In jedem Fall müssen dabei die entstehenden Metabolite bekannt und in reiner Form verfügbar sein, um die Etablierung einer Methode zu deren Quantifizierung und damit zur Bestimmung der Enzymaktivität zu ermöglichen. Dafür ist ein hoher Aufwand erforderlich. Das Screening einer Vielzahl von Substanzen bezüglich ihrer Eigenschaften als Substrate oder Inhibitoren von Cytochrom P-450-Enzymen, das bei der Arzneimittelentwicklung [Wrighton et al. 1996] oder zur Charakterisierung der Bindungsstelle dieser Enzyme [Faßbender 1997] wichtige Informationen bereitstellen kann, ist damit kaum möglich.

Eine Alternative zum bisherigen Vorgehen läßt sich aus den physikochemischen Eigenschaften der Cytochrom P-450-Enzyme ableiten. Da diese Enzyme mit ihren Kofaktoren Redox-Systeme darstellen [Guengerich 1983], sollte es prinzipiell möglich sein, bei entsprechender Versuchsanordnung den Elektronentransfer beim Abbau von Substraten als einen elektrischen Strom zu messen. Die Stromstärke sollte dann durch Substrat- und ggf. Inhibitorkonzentration beeinflussbar sein. Die Entwicklung eines Biosensors mit Cytochrom P-450 erscheint daher als eine interessante

Alternative für die Aktivitätsbestimmung, insbesondere für das Screening einer größeren Anzahl von möglichen Substraten oder Inhibitoren.

Grundlegende elektrochemische Experimente an Cytochrom P-450-Enzymen wurden in den letzten Jahren weltweit von mehreren Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Zielsetzungen durchgeführt. Das Redoxpaar des bakteriellen P-450<sub>cam</sub> konnte als Nachweis eines Elektronentransfers zwischen einer Metallelektrode und dem Enzym detektiert werden [Kazlauskaitė et al. 1996, Zhang et al. 1997, Joseph et al. 1997, Iwuoha et al. 1998]. In der Arbeitsgruppe von R. Estabrook wurden elektrochemische Experimente an Enzymen des Menschen wie z.B. CYP4A1 und CYP3A4 mit der Zielsetzung der Biosynthese von Metaboliten durchgeführt [Faulkner et al. 1995, Estabrook et al. 1996]. Es gelang ihnen jedoch nicht, die Redoxpaare dieser Enzyme elektrochemisch darzustellen.

Mit der Zielsetzung, erstmals einen Cytochrom P-450-Biosensor zu entwickeln, wurden in der Arbeitsgruppe Fuhr 1997 elektrochemische Untersuchungen am im Vergleich zu humanen P-450 Enzymen wesentlich aktiveren bakteriellen P-450<sub>cam</sub> durchgeführt. Diese bestätigten die prinzipielle Möglichkeit, die natürliche Redoxkette für Cytochrom P-450-Enzyme elektrochemisch zu ersetzen [Joseph et al. 1997].

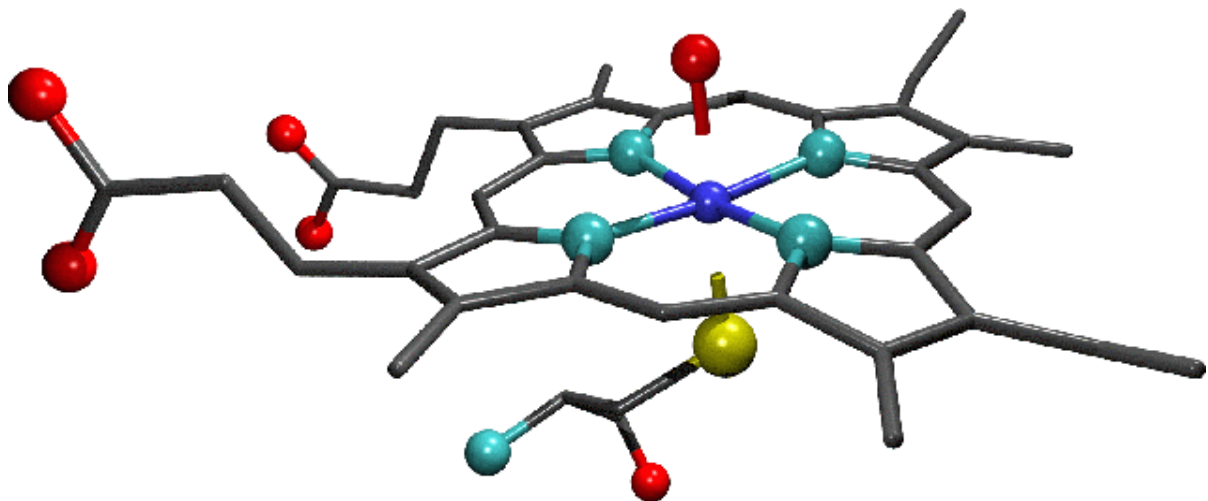
## 1.2 Ziel der Arbeit

Ziel des Forschungsvorhabens ist die Entwicklung eines amperometrischen Sensors, der mit dem wichtigsten Cytochrom P-450-Enzym des Menschen, dem CYP3A4, beschichtet ist. Mit diesem soll in Abhängigkeit von der Umsatzgeschwindigkeit zugegebener Substrate, ein Stromfluß gemessen werden. Dazu sollen Methoden zur Immobilisierung des CYP3A4-Enzyms auf einer Elektrode entwickelt und gegebenenfalls Mediatoren geprüft werden, um den Elektronentransfer zwischen Enzym und Elektrode zu optimieren. Das Redoxverhalten solcher CYP3A4-Elektroden soll dabei unter Verwendung geeigneter Methoden charakterisiert werden. Ferner soll die katalytische Aktivität derartiger Elektroden exemplarisch in Gegenwart spezifischer Substrate untersucht werden. Ob der mit der Elektrode meßbare Elektronentransfer tatsächlich katalytisch ist, soll durch entsprechende Produktanalysen überprüft werden. Ergänzend zu den Untersuchungen zur katalytischen Aktivität sollen weitere spezifische Substrate einbezogen werden. Schließlich soll die Übertragbarkeit der entwickelten Methode beispielhaft an dem für den Arzneistoffmetabolismus zweitwichtigsten humanen P-450-Enzym, dem CYP2D6 untersucht werden.

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Physikalische Eigenschaften der P-450-Enzyme

Die Cytochrom P-450-Enzyme sind Hämproteine [Ortiz de Montellano et al. 1983], bestehend aus über 500 Aminosäuresequenzen und einer Tetrapyrrolgruppe als prosthetischer Teil mit einem Eisen<sup>2+</sup> (Ferro)- oder Eisen<sup>3+</sup> (Ferri)-Zentralatom. Das Ferri- bzw. Ferro-Eisen ist koordinativ mit den Stickstoffatomen der Tetrapyrrolringe verknüpft. Die Struktur kann als hexavalenter oktaedraler Komplex mit Eisen als Zentralatom beschrieben werden. Die fünfte (X) und sechste (Y) Koordinationstelle des Eisens wird dabei durch eine Thiolatgruppe des Cysteins bzw. durch ein Wassermolekül besetzt [Champion et al. 1982] (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Häm-Zentrum des P-450. Blau: Eisen, Rot: Sauerstoff, Gelb: Schwefel, Türkis: Stickstoff; die Wasserstoffatome sind nicht eingezeichnet.**

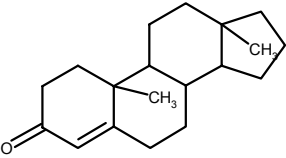
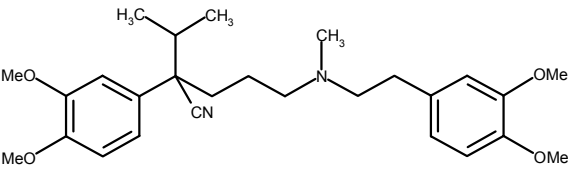
Das P-450 kann in zwei Spinzuständen vorliegen, im sogenannten low-spin-Zustand (LS), bzw. im high-spin-Zustand (HS). Während im LS-Zustand die fünf 3d Elektronen des Fe<sup>3+</sup> bzw. sechs 3d Elektronen des Fe<sup>2+</sup> maximale Spinpaarung erreichen, liegen die 3d Elektronen im HS Zustand maximal ungepaart vor. Normalerweise werden jene Häm-Systeme, die sechsfach koordiniert sind, im niedrigeren Spinzustand, und jene, die fünffach koordiniert sind, im höheren Spinzustand vorgefunden. Aufgrund der unterschiedlichen Koordinationsstruktur ist der Ionenradius für den HS-Zustand größer als jener für den LS-Zustand [Shannon et al. 1970]. Im HS-Zustand ist das Fe-Zentralatom aus der Ebene des

Porphyrinrings verschoben, da in dieser Anordnung das Zentralatom in der Ebene zuwenig Platz vorfindet.

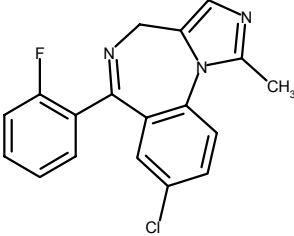
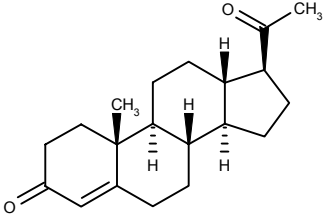
### 2.1.1 Cytochrom P-450 3A4 (CYP3A4)

Das Cytochrom P-450 3A4 ist quantitativ das wichtigste CYP-Enzym in der menschlichen Leber. Der Anteil des CYP3A4 beträgt etwa 30% des Gesamtgehaltes an P-450 in der Leber [Guengerich 1999]. Allerdings wird es nicht nur in der Leber, sondern auch in einigen extrahepatischen Geweben, wie z.B. in Dünndarm-Enterozyten und der Lunge exprimiert [Kaminsky et al. 1992]. Da CYP3A4 im Dünndarm ebenfalls quantitativ die größte Rolle spielt, ist es maßgeblich am enteralen First-Pass-Metabolismus beteiligt, wodurch die geringe orale Bioverfügbarkeit einiger spezifischer CYP3A4-Substrate begründet werden kann [Kolars et al. 1991]. CYP 3A4 besitzt ein breites Substrat-Spektrum und ist wesentlich am Metabolismus von endogenen sowie exogenen Substanzen beteiligt. Die große Variabilität der Substratstrukturen zeigt sich darin, daß sowohl relativ kleine Substrate wie Codein (MW: 299) als auch große wie Cyclosporin (MW: 1201) zu den Substraten des CYP3A4 gehören. Die hohe Regio- und Sterioselektivität weist darauf hin, daß CYP3A4 einen relativ großen substratbindenden Bereich mit komplexer Topologie besitzt.

#### 2.1.1.1 Substrate und spezifische Reaktionen von CYP3A4

Substrat	Molekularformel	Art der Reaktion
Testosteron		Hydroxylierung
Verapamil		Dealkylierung

Fortsetzung siehe nächste Seite.

Substrat	Molekularformel	Art der Reaktion
Midazolam		Hydroxylierung
Progesteron		Hydroxylierung

**Tabelle 2: Substrate und spezifische Reaktionen von CYP3A4.**

### 2.1.1.2 Abbau von Verapamil durch CYP3A4

In Abbildung 2 sind die P-450-Enzym-vermittelten Abbauege von Verapamil dargestellt. Der Hauptabbaueweg ist die Bildung von Norverapamil und D617 durch N-Dealkylierung. Dafür ist hauptsächlich CYP3A4 verantwortlich [Kroemer et al. 1993]. Für die Bildung von D702 und D703 durch O-Demethylierung sind dagegen hauptsächlich andere Isoenzyme wie z.B. CYP1A2, CYP2C, CYP2D6 und CYP2E1 verantwortlich. Welchen Anteil CYP3A4 bei der Bildung dieser Metabolite besitzt, ist bisher nicht eindeutig geklärt.

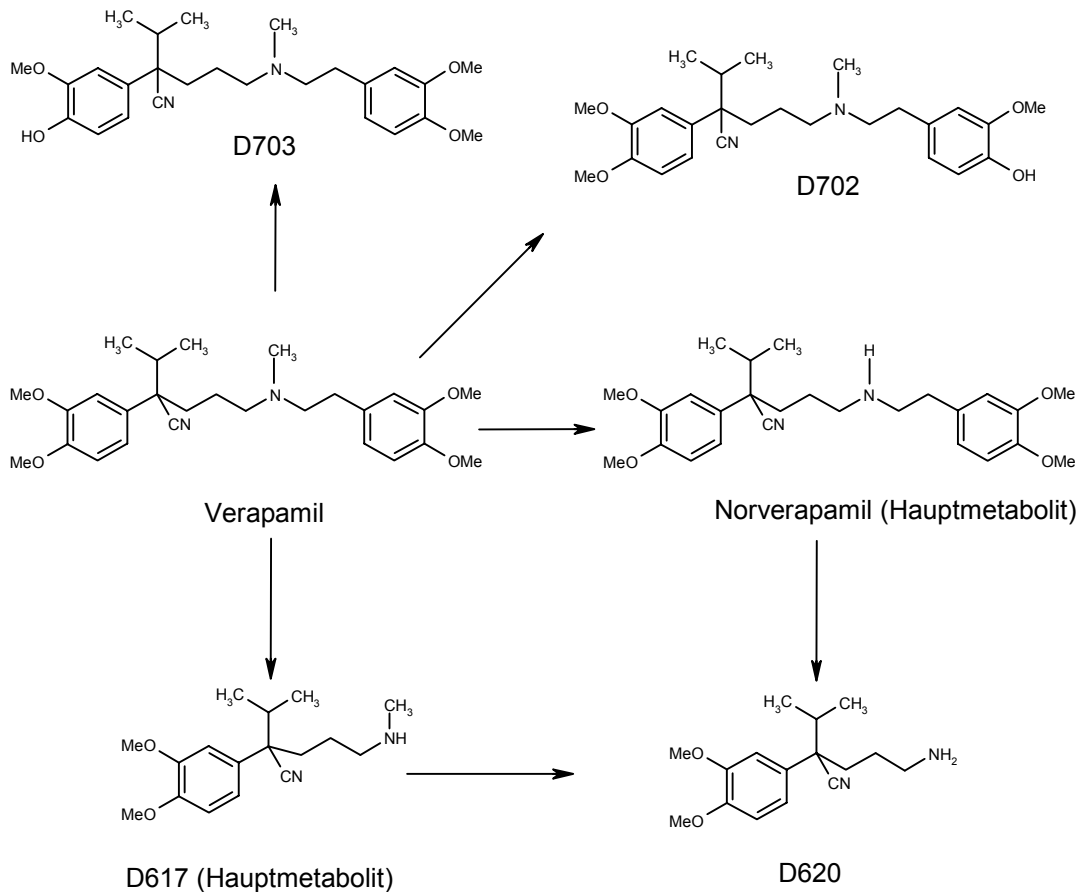


Abbildung 2: Abbauweg des Verapamils durch Cytochrom P-450.

### 2.1.2 Cytochrom P-450 2D6 (CYP2D6)

Auch das Cytochrom P-450 2D6 nimmt eine besondere Stellung in der P-450-Enzymfamilie ein, da dieses Enzym einen genetischen Polymorphismus aufweist und mindestens 30 unterschiedliche Medikamente durch dieses Enzym abgebaut werden [Smith et al. 1978]. Der Anteil des CYP2D6 beträgt etwa 4% des Gesamtgehaltes an P-450 in der Leber. Wirkstoffe aus den Arzneimittelklassen trizyklische Antidepressiva,  $\beta$ -Blocker, Antiarrhythmika sind oft Substrate des CYP2D6. Alle CYP2D6 Substrate besitzen ein basisches Stickstoffatom ( $pK_a > 8$ ), das beim physiologischen pH ionisiert vorliegt [Wolff et al. 1985].



### 2.1.2.1 Substrate und spezifische Reaktionen von CYP2D6

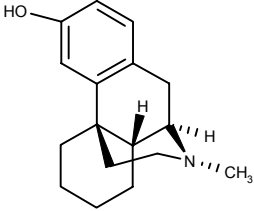
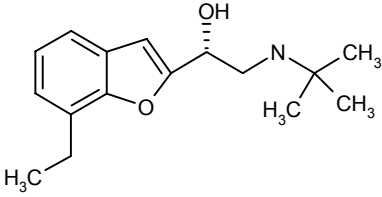
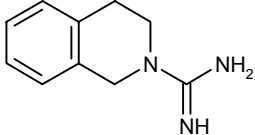
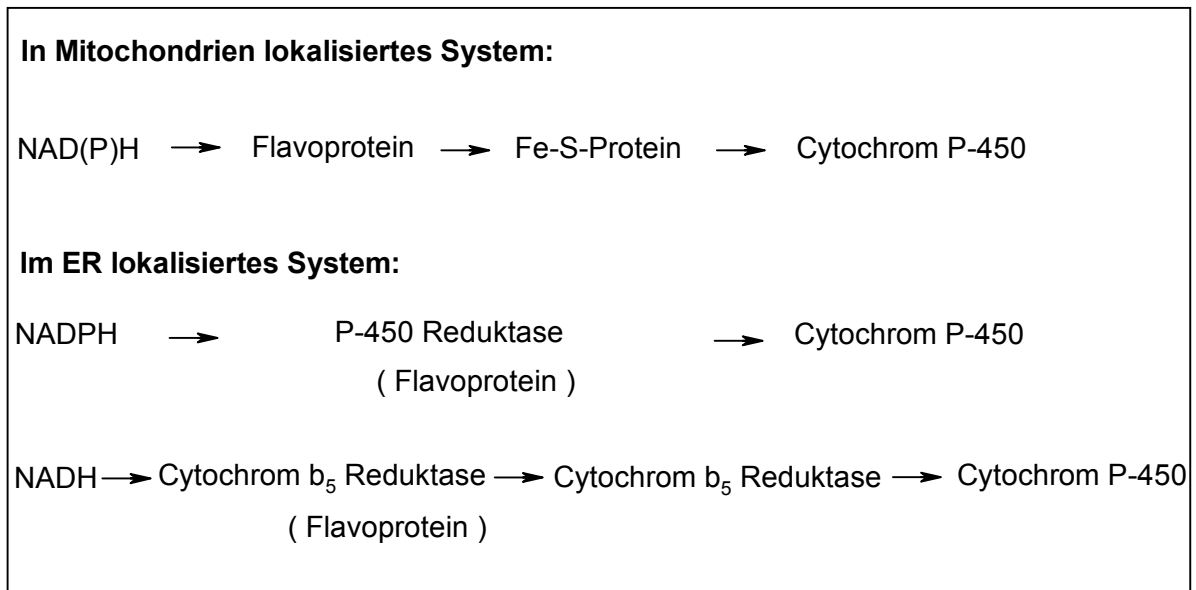
Substrat	Molekularformel	Art der Reaktion
Dextromethorphan		Demethylierung
Bufuralol		Hydroxylierung
Debrisoquin		Hydroxylierung

Tabelle 3: Substrate und spezifische Reaktionen von CYP2D6

## 2.2 Elektronenübertragung im P-450-System

Abbildung 3 zeigt eine vereinfachte Darstellung des Weges der zur Substratoxidation notwendigen Elektronenübertragung in den verschiedenen Cytochrom P-450-Enzymen. Beim ER-lokalisierten System kann das zweite der beiden pro Oxidation notwendigen Elektronen auch über Cytochrom b<sub>5</sub> Reduktase und Cytochrom b<sub>5</sub> übertragen werden [Gunsalus 1968].



**Abbildung 3: Elektronenübertragungswege in unterschiedlichen P-450-Systemen.**

## 2.3 Reaktionsmechanismus

Die Cytochrom P-450-Enzyme besitzen drei unterschiedliche Arten von katalytischer Aktivität. Die bekannteste Reaktion, die durch P-450-Enzyme katalysiert wird, ist eine Monooxygenasereaktion, d.h. Insertion von einem Sauerstoffatom in das Substrat, während das andere Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird [White et al. 1980, Dawson 1988]. Die zweite Art von Aktivität ist die Abspaltung der reduzierten Sauerstoffspezies aus dem Enzym-Sauerstoff-Komplex, die sog. Entkopplung des P-450-Katalysezyklus oder auch Oxidase-Aktivität. Dabei wird Superoxid bzw. Wasserstoffperoxid gebildet, die ihrerseits weitere Reaktionen eingehen [Staudt et al. 1974, Zhukov et al. 1982].

Die dritte Art von Aktivität ist die Reduktase-Aktivität, welche unter anaeroben Bedingungen unter direktem Elektronentransfer von Enzym zu Substrat stattfindet [Nakahara et al. 1993]. Der Mechanismus der gut untersuchten Monooxygenase-Reaktion kann folgendermaßen beschrieben werden:



Die Kristallstruktur von substratfreiem P-450 zeigt, daß der substratbindende Bereich mit Wassermolekülen angefüllt ist und eines davon an das Metall, ein oktaedrisches low-spin-Fe(III)-Zentrum, koordiniert ist [Paulus 1986, Black et al. 1987]. Bei der Bindung des Substrats werden diese Wassermoleküle verdrängt, und die

Koordinationszahl des Eisens wird auf fünf erniedrigt. Bei der Änderung der Koordinationszahl geht das Eisen in den high-spin-Zustand über. Durch die Änderungen der Koordinationszahl, des Spin-Zustandes und der Polarität des Eisenzentrums wird das Redoxpotential des Eisens erhöht, so daß es leichter zum Eisen(II) reduziert wird. Dieser Reduktionsschritt ermöglicht dann die Bindung des Sauerstoffs, da außer dem reduzierten Eisenzentrum auch eine freie Koordinationsstelle entsteht. Sobald der Sauerstoff gebunden ist, wird der Eisen-Sauerstoff-Komplex durch die Aufnahme eines zweiten Elektrons reduziert. Unter normalen Umständen wird die O-O-Bindung in dieser Zwischenstufe heterolytisch gespalten. Dabei wird Wasser freigesetzt, und es entsteht die Eisen-Oxo-Spezies, die das Substrat hydroxyliert. Mit der Verdrängung des oxydierten Substrats durch das Wasser schließt sich der Katalysezyklus [Paulus 1986].

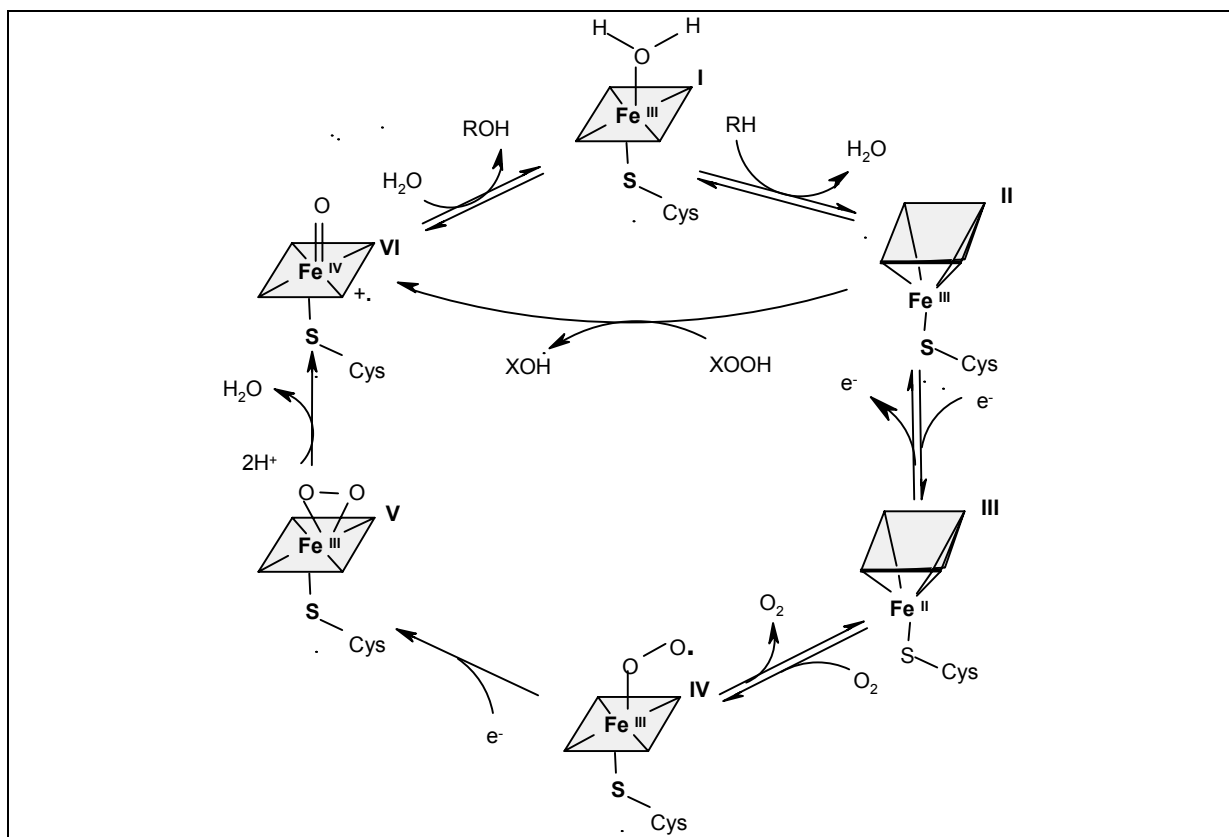
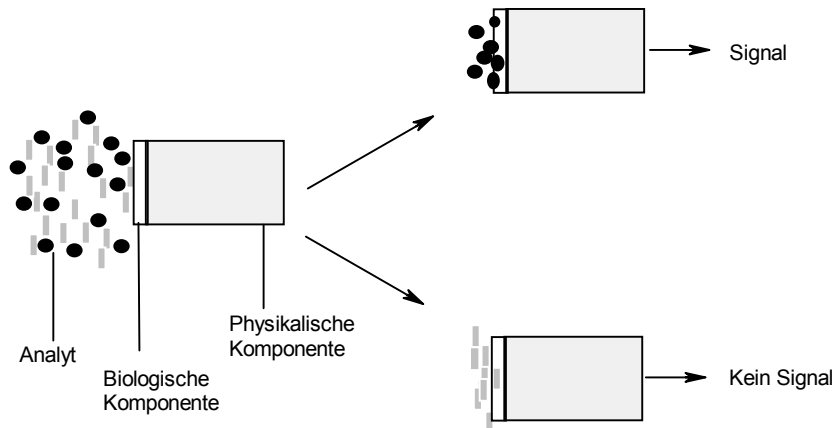


Abbildung 4: Der für das Cytochrom P-450 vorgeschlagene Katalysemechanismus.

## 2.4 Biosensoren

Die charakteristische Eigenschaft eines Biosensors besteht darin, daß in einem einzigen Gerät ein biologisch sensitives Element mit einem Signalwandler (transducer) integriert oder zumindest in räumlicher Nähe gekoppelt vorliegt, so daß ein reagenzloses Meßsystem mit hoher Spezifität für den Analyten entsteht [Albery et

al.1987]. Mit der Verwendung eines biologischen Elementes nutzt man die einzigartige Spezifität biologischer Moleküle für bestimmte Analyte. Die Funktion eines biologischen Elementes in einem Biosensor besteht darin, daß es durch seine spezifische Wechselwirkung mit dem Analyt eine physikalische oder chemische Änderung hervorruft, die mit dem entsprechenden Transducer detektiert bzw. gemessen werden kann (Abb.5).

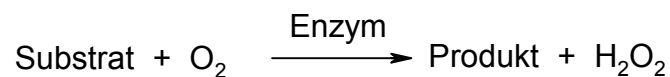


**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Biosensors.**

Der Transducer kann in vielen Bauformen abhängig von verschiedenen Parametern (elektrochemische, optische, Massen- und thermische Änderungen) konstruiert werden. Das vom Transducer übertragene Signal steht in der Regel in direktem Zusammenhang mit der Konzentration des Analyten.

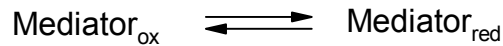
### **2.4.1 Arten von Biosensoren**

Man unterscheidet drei Entwicklungsstufen von Biosensoren [Higgins et al. 1987]. Die erste Generation von Biosensoren basiert auf natürlichen enzymatischen Reaktionen des folgenden Typs:



Diese Enzymelektroden werden nur zur Detektierung von Sauerstoff (bzw. von Peroxid) verwendet. Aus dem Sauerstoffverbrauch bzw. der Bildung des Peroxids kann auf die Substratkonzentration geschlossen werden.

Bei Biosensoren der zweiten Generation reagiert das Enzym mit seinem Substrat. Dabei wird es zunächst oxidiert bzw. reduziert. Das Enzym wird dann im zweiten Schritt durch einen sog. Mediator re-oxidiert bzw. re-reduziert. Anschließend wird der Mediator an der Elektrode wieder regeneriert [Hall 1990].



Biosensoren der dritten Generation repräsentieren ein einfaches und direktes Funktionsprinzip. Das Enzym wird hier nach der Reaktion mit dem Substrat selbst an der Elektrode regeneriert. Voraussetzung dafür ist, daß das Enzym elektrochemische Aktivität besitzt, und daß ein ausreichend schneller Elektronentransfer zwischen Elektrode und dem Redoxzentrum des Enzyms besteht. Bei den meisten redoxaktiven Enzymen bereitet jedoch letzteres Probleme, die oft auf sterische Hinderungen zwischen Redoxzentrum und Elektrode zurückzuführen sind. Dies kann in den meisten Fällen durch geeignete Modifizierung bzw. Auswahl des Elektrodenmaterials verbessert werden [Hall 1990].

## 2.5 Immobilisierung der Enzyme

Ein effizienter Elektronentransfer zwischen dem Reaktionszentrum eines Biomoleküls und dem Transducer ist die Voraussetzung für einen elektrischen Biosensor. Sie ist nur dann möglich, wenn das Biomolekül mit der Transduceroberfläche verbunden bleibt. Damit steht die Entwicklung eines geeigneten Immobilisierungsverfahrens bei der Herstellung von Biosensoren im Vordergrund. Ferner erklärt sich die große Bedeutung der Enzymimmobilisierung für die Anwendung aus einer Reihe von Vorteilen, die das trägerfixierte Enzym im Vergleich zu seiner löslichen Form besitzt. Solche Vorteile sind:

- *die Möglichkeit, das Enzym nach der Reaktion von der Lösung abzutrennen und einer erneuten Verwendung zuzuführen*
- *die Möglichkeit einer kontinuierlichen Prozeßführung*
- *die oftmals erhöhte Stabilität gegenüber thermischen oder chemischen Belastungen*

### 2.5.1 Strategien und Methoden

Zahllose Verfahren zur Immobilisierung biochemischer Komponenten sind für verschiedene Anwendungsbereiche beschrieben. In Tabelle 4 sind die Vorzüge und Nachteile der wichtigsten Methoden zusammengefaßt.

<b>Prinzip</b>	<b>Methoden</b>	<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
Physisorption	Hydrophobe Wechselwirkung, Coulomb-Kräfte	Einfache Protokolle, universell anwendbar	wenig stabil, wenig definiert
kovalente Bindung	verschiedenste Kupplungstechniken [Johnsson et al. 1991, William et al. 1994, Löfas et al. 1990] Elektropolymerisation [Bartlett und Cooper 1993, Heiduschka et al. 1996]	universell anwendbar, sehr flexibel, 3-dimensionale Strukturen möglich	aufwendige Methode und Optimierung
Filmtechniken	Lipid-Einzel- und Doppelschichten [Nasser et al. 1995] Langmuir-Blodgett	einfache Protokolle, gut definiert	nicht universell anwendbar, unterschiedliche Stabilität
Selbstanordnung (SAM)	Thiole auf Gold [Nuzzo et al. 1983, Rickert et al. 1996, Sigal et al. 1996], Polyionen [Decher et al. 1994]	gut definiert, orientiert, hohe Stabilität	nur bei wenigen Substraten anwendbar

**Tabelle 4: Übersicht der gängigsten Immobilisierungsverfahren.**

### **3 Experimenteller Teil**

#### **3.1 Material und Methoden**

##### **3.1.1 Materialien**

###### **3.1.1.1 Reagenzien und Substanzen**

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
1-Ethyl-3-(3-Dimethylamino-propylcarbodiimid (EDC)	Merck-Schuchardt, München
1,2 Diaminoethan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
(3-Aminopropyl)-Triethoxysilan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
4,4'-Dithiodipyridin (Aldrithiol)	Aldrich Chemie GmbH, München
4-Mercaptoanilin	Aldrich Chemie GmbH, München
Anilin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BSA	Sigma Chemie GmbH, München
Chinidin	Sigma Chemie GmbH, München
Cholranil	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cystaminhydrochlorid	Aldrich Chemie GmbH, München
Cytochrom P-450 2D6 (137µM)	Gentechnologisch hergestellt (zur Verfügung gestellt von Dr. Thomas Friedberg [Pritchard et al. 1997])
Cytochrom P-450 3A4 (73µM)	Gentechnologisch hergestellt (zur Verfügung gestellt von Dr. Thomas Friedberg [Pritchard et al. 1997]).
Didodecyldimethylammonium-bromid (DDAB)	Aldrich Chemie GmbH, München
Dextromethorphan	Sigma Chemie GmbH, München

**Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Bezugsquellen (fortgesetzt).**

Fortsetzung:

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Dihexadecylphosphat (DHP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Diaminoethan	Aldrich Chemie GmbH, München
1,2-Ditetradecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (Dimyristoylphosphatodylcholin, DMPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
1,2-Didodecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (Dilaurylphosphatodylcholin, DLPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ferrocenmonocarbonsäure	Aldrich Chemie GmbH, München
Glutardialdehyd	Aldrich Chemie GmbH, München
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinol] Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Katalase	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Ketoconazol	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Kobalt (III)-Sepulchrat-Trichlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Laurinsäure	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Midazolam	Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen
Mercaptopropansulfonsäure (MPS)	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
N-Acetylcystein	Aldrich Chemie GmbH, München
N-Hydroxysulfosuccinamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Bezugsquellen (fortgesetzt).



Fortsetzung:

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazinhydrochlorid (Neutralrot)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pyridin-3-Carboxaldehyd-Thiocarbazon (PATS)	Aldrich Chemie GmbH, München
Polydimethyldiallylammoniumchlorid (PDDA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Polylysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Progesteron	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Poly-(Styrolsulfonsäurenatriumsalz) (PSS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pyrrrol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Succinanhydrid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Superoxiddismutase	Fluka Chemie AG, Buchs
Thiophen-3-Essigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Verapamil	Knoll Deutschland GmbH, Ludwigshafen

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Bezugsquellen.

## Puffer und Lösungen

**Phosphat Puffer:** 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM KCl; eingestellt mit NaOH auf pH 7,4 bzw. 5,5

### **Mediatoren**

1. Neutralrot: 250  $\mu\text{M}$  in 50 mM Phosphatpuffer/50 mM NaCl  
 2. Kobaltsepulchrat: 1 mM in 50 mM Phosphatpuffer/100 mM NaCl  
 3. Ferrocenmonocarbonsäure: 4 mM in 50 mM Phosphatpuffer/100 mM KCl

### **Substrat- bzw. Inhibitorstammlösung**

1. Verapamil: 50 mg/20 ml Lösung  
 2. Midazolam Hydrochlorid: 5 mg/ml Lösung  
 3. Progesteron: 100 mM ethanolische Lösung  
 4. Chinidin: 100 mM in Phosphatpuffer (10% DMSO, zuerst in DMSO angelöst und anschließend verdünnt)  
 5. Dextromethorphan: 10 mM (3% DMSO, zuerst in DMSO angelöst und anschließend verdünnt)  
 6. Ketoconazol: 10 mM ethanolische Lösung

## Herstellung der Referenzelektrode (Ag/AgCl) für die Elektrolyse

- ♦ *Reinigung eines Silberdrahts mit 3 mM Salpetersäure*
- ♦ *Elektrolyse mit Silberdraht als Anode bei einer Stromdichte von 0,4 mA/cm<sup>2</sup> für 30 Minuten in 100 mM KCl*
- ♦ *Altern lassen für 1-2 Tage*
- ♦ *Einschließen in einer Glasröhre mit einer Glasfritte. Füllelektrolyt: 3 M KCl*  
[Sawyer 1995]

### **3.1.1.2 Immobilisierung**

Es wurden eine Reihe verschiedener Versuche unternommen, die Elektrode zu modifizieren bzw. das Enzym auf der Elektrode zu immobilisieren, um den Elektronentransfer zu verbessern. Da dieser auch von dem verwendeten Elektrodenmaterial abhängt, kamen verschiedene Materialien (pyrolytischer Graphit, Glas-Kohle, Platin, Gold und Indiumzinnoxid) zum Einsatz.

### 3.1.1.2.1 Reinigung bzw. Polierung der Elektrode

#### Glaskohle (GC) und Platinelektrode (Pt):

- ◆ Polieren mit einer Paste aus Aluminiumoxid und Wasser (Korngröße des  $Al_2O_3$ : 0,1  $\mu m$  bzw. 0,05  $\mu m$ ) bis die Oberfläche spiegelblank wird
- ◆ gründliche Reinigung mit destilliertem Wasser
- ◆ 10 Minuten ins Ultraschallbad
- ◆ abtupfen mit Kleenextüchern

#### Pyrrolytische Elektrode (PGE):

- ◆ nacheinander Polieren mit SiC-Papier verschiedener Körnung (600, 900 und 1500)
- ◆ gründliche Reinigung mit destilliertem Wasser
- ◆ 10 Minuten ins Ultraschallbad
- ◆ Abtupfen mit Kleenextüchern

#### Gold (Au)-Elektrode:

- ◆ Eintauchen in eine Lösung aus  $C_2H_5OH:H_2O:KOH$  (60:39:1) für 1 Stunde
- ◆ gründliche Reinigung mit destilliertem Wasser
- ◆ Eintauchen in verdünntes Königswasser ( $HCl:HNO_3:H_2O$ ; 3:1:5) für 30 s
- ◆ 10 Minuten ins Ultraschallbad
- ◆ Trocknen an der Luft

#### Indiumzinnoxid (ITO)-Elektrode:

- ◆ Eintauchen in 2 N NaOH für 3 Stunden
- ◆ gründliche Reinigung mit destilliertem Wasser
- ◆ 10 Minuten ins Ultraschallbad
- ◆ Trocknen an der Luft

### 3.1.1.2.2 Physisorption

- ◆ Auftropfen von 10  $\mu l$  73.5  $\mu M$  CYP3A4 auf die gereinigte Pt- bzw. GC-Elektrode
- ◆ Trocknen der beschichteten Elektrode an der Luft für 3-4 Stunden

### 3.1.1.2.3 kovalente Bindung

#### 3.1.1.2.3.1 Cross linking mit Glutardialdehyd

##### a) Auf blanker Elektrode (Pt, PG, ITO, GC)

- ♦ Herstellung einer Lösung aus 20  $\mu\text{l}$  (73  $\mu\text{M}$ ) CYP3A4, 80  $\mu\text{l}$  (pH=7,4), 3 mg BSA und 50  $\mu\text{l}$  (2,5%) Glutardialdehyd [Schmid RD 1991]
- ♦ Auftropfen von 5  $\mu\text{l}$  dieser Lösung auf die gereinigte Platin- bzw. Glaskohleelektrode
- ♦ Trocknen der beschichteten Elektrode an der Luft für 3-4 Stunden

##### b) Auf Laurinsäure-modifizierter PG-Elektrode

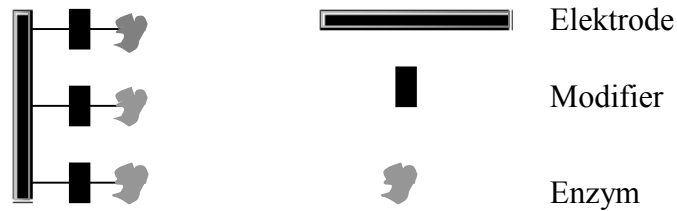
- ♦ Modifizierung der PG-Elektrode durch Eintauchen in 5 mM ethanolische Laurinsäure für 10 Minuten [Hanzlik et al. 1995]
- ♦ Auftropfen von 5  $\mu\text{l}$  Glutardialdehyd-Enzym-Mischung (siehe Abschnitt 3.1.1.2.3.1a) auf die modifizierte PG-Elektrode
- ♦ Trocknen der beschichteten Elektrode an der Luft für 3-4 Stunden

##### c) Auf oxidiertem Pt-Elektrode

- ♦ Potentiometrische Oxidation bei 2.5 V für 5 min, um die Adhäsion der Enzymschicht auf der Elektrode zu verbessern.
- ♦ Gründliches Waschen mit Millipore Wasser
- ♦ Herstellung der Glutardialdehyd-Enzym-Mischung (120  $\mu\text{g}$  Enzym+250  $\mu\text{g}$  BSA+1,8  $\mu\text{l}$  GA in 100  $\mu\text{l}$  Phosphatpuffer)
- ♦ Auftropfen von 5  $\mu\text{l}$  der oben genannten Glutardialdehyd-Mischung auf die Pt-Elektrode [Bilitewski et al.1991]

#### 3.1.1.2.3.2 Kovalente Bindung an modifizierter Elektrode

Auch Immobilisationstechniken mittels vorgeschalteter Modifizierung der Elektrodenoberfläche wurden getestet. Im einzelnen kamen folgende Methoden zum Einsatz: Silanisierung und anschließende Modifizierung mit Chloranil bzw. Succinanhydrid [Pittner et al. 1987], Modifizierung mit den Mercaptoverbindungen, wie 4-4'-Dithiodipyridin, Mercaptoanilin [Allen 1984], N-Acetylcystein [Cooper et al. 1993] und Cystamin [Lötzbeier et al. 1994].



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der kovalenten Bindung an einer modifizierten Elektrode.**

#### **a) Cystamin-modifizierte Goldelektrode**

- ♦ *Eintauchen der Au-Elektrode bei Raumtemperatur in eine 1mM wäßrige Lösung aus Cystamin (2,2'-Diaminodiethyl-disulfid) für 3 Stunden; Bildung einer monomolekularen Schicht des Cystaminderivats auf der Au-Elektrode*
- ♦ *Eintauchen der modifizierten Au-Elektrode für 3 Stunden in eine 3 µM Enzymlösung, bestehend aus 10 mM HEPES-Puffer (pH = 7,5), der zur Aktivierung der Carboxylreste des Enzyms 10 µM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) enthält [Lötzbeyer et al. 1994]*
- ♦ *Trocknen an der Luft*

#### **b) N-Acetylcystein modifizierte Goldelektrode**

- ♦ *Eintauchen der Elektrode für 2 Stunden in 2 mM N-Acetylcystein Lösung in 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH = 7)*
- ♦ *Waschen mit destilliertem Wasser*
- ♦ *Aktivierung der modifizierten Elektrode durch Inkubation mit 10% EDC Lösung für 2 Stunden bei 25 °C*
- ♦ *Eintauchen der EDC aktivierten Elektrode in Enzymsuspension (1mg/ml CYP3A4) für 6 Stunden bei 4°C [Cooper et al. 1993]*
- ♦ *Waschen mit 10 mM Natriumphosphatpuffer*

#### **c) 4-Mercaptoanilin/4,4'-Dithiodipyridin modifizierte Goldelektrode**

- ♦ *Reinigung des Oberflächenmodifizierers Mercaptoanilin durch Ausschütteln mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O und anschließende Aufarbeitung in kaltem CH<sub>3</sub>OH und Ether*
- ♦ *Pre-Aktivierung der Au-Elektrode durch Eintauchen in 1mM 4,4'-Dithiodipyridin für 30 s*

- ♦ Eintauchen der Au-Elektrode in 1 mM Mercaptoanilin Lösung aus 100 mM  $\text{NaClO}_4$  und 20 mM Phosphatpuffer für 2 min [Allen et al. 1984]
- ♦ Eintauchen der modifizierten Elektrode in CYP3A4-Suspension (1mg/ml) für 2 Stunden
- ♦ Waschen mit Millipore Wasser und anschließendes Trocknen an der Luft

#### d) Silanisierte und Chloranil-modifizierte Pt-Elektrode

- ♦ Silanisierung durch Eintauchen der Elektrode für 30 min in eine 10%ige Lösung von 3-Aminopropyltriethoxysilan in Toluol
- ♦ Aktivierung der silanisierten Elektrode durch Eintauchen in 1%igem Chloranil (in Toluol) für 30 s bei 25°C; Waschen mit Toluol und Aceton
- ♦ Aktivierung der modifizierten Elektrode durch Inkubation mit 10% EDC Lösung für 2 Stunden bei 25 °C
- ♦ Kopplung mit Enzym durch Eintauchen der modifizierten Elektrode in CYP3A4-Suspension (1mg/ml) für 2 Stunden [Pittner et al. 1987]
- ♦ Waschen mit Millipore Wasser und anschließendes Trocknen an der Luft

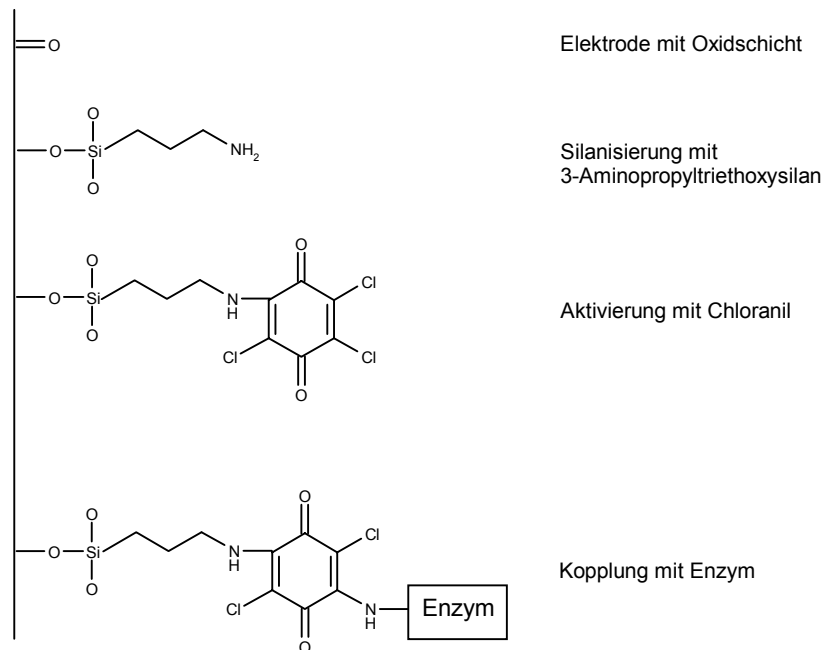


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Chloranil-Enzymelektrode.



## b) Lipidmembranen

Die Immobilisierung mit Didodecyldimethylammoniumbromid (DDAB), Dihexadecylphosphat (DHP) und Phosphatodylcholin-Derivaten wie Dimyristoylphosphatodylcholin (DMPC) und Dilaurylphosphatodylcholin (DLPC) als Matrizen [Nassar et al. 1995] wurde wie folgt durchgeführt:

- ◆ *Herstellung einer Suspension (10 mM) jeweils aus den entsprechenden Lipiden*
- ◆ *Behandlung der Suspension für 24 Stunden oder länger in einem Ultraschallbad bis sie klar wird*
- ◆ *Mischung des Enzyms (7  $\mu$ l) mit der jeweiligen Suspension (3  $\mu$ l)*
- ◆ *Beschichtung der Elektrode (Pt, GC und PG) durch Auftropfen von 5  $\mu$ l der jeweiligen Mischung auf die Elektrodenoberfläche*
- ◆ *Trocknen an der Luft*

## c) Elektrochemisch abgelagerte leitende Polymere

Als Immobilisierungsmatrix wurde hier Polythiophenessigsäure [Willner et al. 1992] und Polypyrrol [Charles et al. 1982, Warriner et al. 1996] verwendet.

### 1. Polythiophen-3-Essigsäure:

- ◆ *„Scanning“ der Pt-Elektrode für 1 Stunde bei 100 mV/s im Bereich von 0 V bis 1,6 V in einer Lösung von 2 mM Thiophen-3-Essigsäure in Phosphatpuffer (10% DMF)*
- ◆ *Waschen mit H<sub>2</sub>O bzw. Ethanol*
- ◆ *Inkubation der Elektrode mit einer Enzymlösung aus 4,8  $\mu$ M CYP3A4, 10 mM Carbodiimid und 5 mM N-Hydroxysulfosuccinamid für 8 Stunden*
- ◆ *Waschen mit Phosphatpuffer*

### 2. Polypyrrol:

- ◆ *„Scanning“ der Pt-Elektrode im Potentialbereich von -250 mV bis 900mV bei 50 mV/s für 4 Zyklen in einer Lösung von 7.3  $\mu$ M CYP3A4 und 20 mM Pyrrol in 50 mM SDS (pH=6, O<sub>2</sub> frei)*
- ◆ *Waschen mit 50 mM Phosphatpuffer (pH=7), der 50 mM KCl enthält*
- ◆ *Trocknen an der Luft*



### 3.1.1.2.4 Selbstanordnung

#### 1. PATS

- ◆ *Eintauchen der Elektrode in 1 mM ethanolischer PATS für 30 Minuten*
- ◆ *Waschen mit Millipore Wasser und Trocknen an der Luft*
- ◆ *Eintauchen der Elektrode in Enzym-Suspension (1mg/ml) für 30 Minuten [Baymann et al. 1991]*
- ◆ *Trocknen an der Luft*

#### 2. Polylysin (PLL)

- ◆ *Oxidation der PG-Elektrode in  $K_2Cr_2O_8:HNO_3$  (25%:10%)-Lösung bei 5 mV/s in einem Potentialbereich von 1500 mV bis 1700 mV zur Aktivierung der COOH-Gruppen auf der Elektrode*
- ◆ *Herstellung der negativ geladenen ITO-Elektrode durch Eintauchen in 2 M NaOH für 10 Minuten*
- ◆ *Auftropfen von 6  $\mu$ L (24 mM) EDC auf die PG- bzw. ITO-Elektrode und Trocknen an der Luft für 20 Minuten*
- ◆ *Auftropfen von 5  $\mu$ l PLL auf die EDC-beschichtete Elektrode und Trocknen an der Luft für 4 Stunden*
- ◆ *Anschließendes Auftropfen von 5  $\mu$ l (73  $\mu$ M) CYP3A4 auf die Elektrode*
- ◆ *Trocknen an der Luft*

#### 3. Polyelektrolyt

Die Präparation der CYP3A4- bzw. CYP2D6–Au-Elektrode erfolgte gemäß Literatur [Lvov et al. 1998]. Zusätzlich wurde CYP3A4 auf Au-Resonator-Elektroden für die QCM-Technik auf diese Weise immobilisiert. Abbildung 9 zeigt die schematische Vorgehensweise beim Aufbau der Enzymelektrode.

#### CYP3A4-Elektrode:

- ◆ *Eintauchen in ethanolische 1 mM MPS-Lösung über Nacht*
- ◆ *Eintauchen der MPS-modifizierten Au-Elektrode in PDDA-Lösung (2mg/ml)*
- ◆ *Entfernen nach 15 Min. aus der PDDA-Lösung und Trocknen an der Luft*
- ◆ *Eintauchen der PDDA-beschichteten Elektrode in Enzym-Lösung 1mg/ml für 20 Min.*
- ◆ *Trocknen an der Luft*

Es wurden auch bis zu 5-fach beschichtete CYP3A4-Elektroden durch alternierendes Eintauchen in die PDDA-Lösung bzw. CYP3A4-Suspension hergestellt.

### CYP2D6-Elektrode:

Die Präparation erfolgte wie bei der CYP3A4-Elektrode. Zusätzlich erfolgte eine zweite Präparation wie folgt:

- ♦ *Eintauchen in ethanolische 1 mM MPS-Lösung über Nacht*
- ♦ *Eintauchen der MPS-modifizierten Au-Elektrode in PDDA-Lösung (2mg/ml)*
- ♦ *Entfernen nach 15 Min. aus der PDDA-Lösung und Trocknen an der Luft*
- ♦ *Eintauchen der PDDA-beschichteten Elektrode in PSS-Lösung (3mg/ml)*
- ♦ *Entfernen nach 15 Min. aus der PSS-Lösung und Trocknen an der Luft*
- ♦ *Eintauchen der PSS-beschichteten Elektrode in Enzym-Lösung 1mg/ml für 20 Min.*
- ♦ *Trocknen an der Luft*

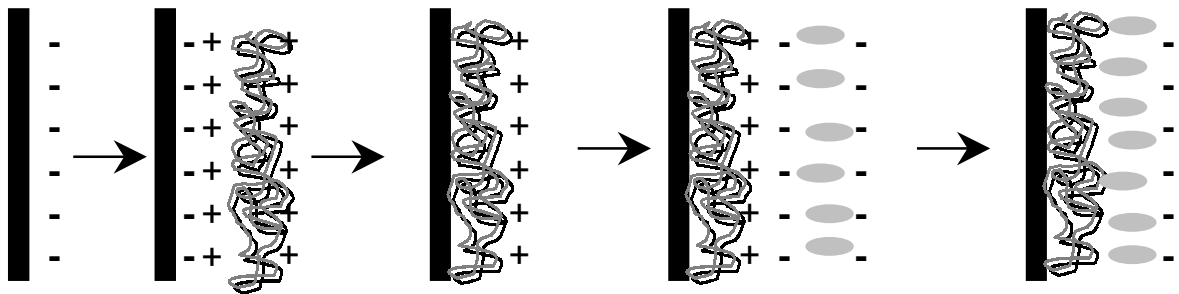


Abbildung 9: Schematische Darstellung des schichtweisen Aufbaus durch elektrostatische Adsorption: Polykation (☞); Enzym (●).

### 3.1.1.3 Geräte

#### 3.1.1.3.1 Quarz Kristall Mikrobalance

Eine Quarzkristall-Mikrowaage (USI System, Fukuoka, Japan) wurde bei den Untersuchungen mittels QCM-Technik verwendet. Die entsprechenden Quarzresonatoren (USI System, Fukuoka, Japan) sind so aufgebaut, daß ein Quarzkristall zwischen zwei flachen Goldelektroden ( $A = 0.16 \text{ cm}^2$ ) liegt. Die Frequenz der verwendeten Resonatoren liegt bei 9 MHz (AT-cut). Die Frequenzkonstante und die Dichte des Quarzkristalls betragen  $1670 \text{ kHz} \cdot \text{mm}$  und  $2,648 \text{ g/cm}^3$ .

### **3.1.1.3.2 Voltammograph**

Die voltammetrischen Messungen wurden mit einem Cyclovoltammograph vom Typ Autolab PGSTA10 (Metrohm, Schweiz) durchgeführt. Ein Teil der Messungen wurde während eines Forschungsaufenthalts in Connecticut an der Connecticut University mit einem Bio Analytical Systems (BAS, Lafayette IN ) CV-100 W aufgenommen. Die Meßzelle besaß eine Drei-Elektroden-Anordnung. Die Arbeitselektrode bestand jeweils aus Glaskohle, pyrrolytischem Graphit, Platin, Indiumzinnoxid oder Gold. Als Referenz- bzw. Gegenelektrode kamen eine Ag/AgCl- oder Calomel- (SCE) bzw. eine Platinelektrode zum Einsatz.

### **3.1.1.3.3 Spektrometer**

Die UV-Spektren des CYP3A4 in Lösung wurden mit einem Spektrophotometer vom Typ Beckmann DU 640 (Fullerton, USA) aufgenommen. Ein Bruins Omega 10 Spektrophotometer in Kombination mit optisch durchlässiger dünner Zelle (OTTLE) (siehe 3.1.2.2.6) kam für die Aufnahme des Absorptionsspektrums des immobilisierten Enzyms zum Einsatz. Die Arbeitselektrode für die OTTLE-Zelle wurde von Bickbee-Mears, St.Paul, MN bezogen.

## **3.1.2. Methoden**

### **3.1.2.1 Quarz-Kristall-Mikrowaage-Technik**

Diese Methode wird oft bei der Charakterisierung von beschichteten Oberflächen verwendet. Die Mikrowaage besteht aus einem sogenannten Resonator, der bei Anschluß an einen Oszillator in Resonanz versetzt werden kann. Der Resonator ist so aufgebaut, daß ein Quarzkristall zwischen zwei flachen Metallelektroden liegt. Die Mikrowaage funktioniert folgendermaßen: Wenn auf eine dünne Quarzkristallscheibe Druck ausgeübt wird, findet eine Delokalisierung der Ladungen im Kristall statt. Eine auf der Quarzscheibe platzierte Elektrode greift das dadurch induzierte elektrische Signal ab. Der Quarzkristall überführt also das mechanische Signal in ein elektrisches Signal.

Ein Grundeigenschaft von Materie ist das Auftreten einer oder mehrerer spezifischer Resonanzfrequenzen. Aufgrund der oben beschriebenen Piezoelektrizität können Schwingungen beim Anlegen eines elektrischen Feldes über die Elektroden in einem Quarzkristall induziert werden. Die Resonanzfrequenz des Kristalls ist bestimmt durch seine physikalischen Eigenschaften wie Dichte, Dicke und Schermodule. Bei

Änderung einer dieser Eigenschaften ändert sich die Resonanzfrequenz. Ein z.B. auf der Elektrode angebrachtes Gewicht führt zu einer Frequenzabnahme. Die Abhängigkeit der Resonanzfrequenz von der Masse der Elektrode wird mit der sogenannten Sauerbrey-Gleichung beschrieben. Mit der Kenntnis der Materialkonstanten des Quarzkristalls kann diese Gleichung zur quantitativen Berechnung extrem kleiner Massen aus den entsprechenden Messungen der Frequenzänderungen verwendet werden.

Die Sauerbrey-Gleichung lautet wie folgt [Sauerbrey 1959]:

Gleichung 1

$$\Delta F = -\frac{f_0^2}{N \cdot \rho_q} \cdot \Delta \frac{M}{A}$$

- $\Delta F$  = Frequenzänderung
- $\Delta M$  = Massenänderung
- $f_0$  = Grundfrequenz des Kristalls
- $N$  = Frequenzkonstante
- $\rho_q$  = Dichte des Quarzes
- $A$  = Fläche der Elektrode

Aus der gemessenen Frequenz kann folglich die Änderung der Masse berechnet werden. Eine vereinfachte Sauerbrey-Gleichung erhält man, indem die Eigenschaften der verwendeten Resonatoren in Betracht gezogen werden:

Gleichung 2

$$\frac{\Delta M}{A} = -C_f \cdot \Delta F$$

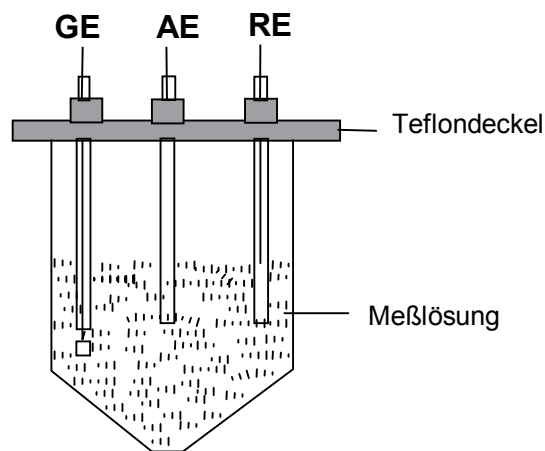
$C_f$  = Schichtwägeempfindlichkeit

Übrige Symbole siehe Gleichung 1

Mit der Kenntnis der Enzymdichte kann man aus der vereinfachten Sauerbrey-Gleichung die Filmdicke berechnen, wobei  $A$  die Fläche der Elektrode ist [Creighton 1990].

### 3.1.2.2 Elektrochemische Meßmethoden

Ein gemeinsames Kennzeichen vieler chemischer und biochemischer Reaktionen ist ein Wechsel des Oxidationszustandes, d.h. ein Ladungstransfer. Die physikalischen Methoden zur Untersuchung von elektrochemischen Ladungstransfer-Reaktionen lassen sich allgemein unter dem Begriff Voltammetrie zusammenfassen. Insbesondere ist darunter die Aufnahme von Strom-Spannungs-Kurven zu verstehen. Voltammetrische Messungen werden im Normalfall in einer Meßzelle mit Drei-Elektroden-Anordnung durchgeführt. Dies sind die Arbeitselektrode (AE), die Referenzelektrode (RE) und die Gegenelektrode (GE) (Abb. 10).



**Abbildung 10: Eine typische Meßzelle. Die Abkürzungen sind im Text erläutert.**

In der vorliegenden Arbeit wurden von den voltammetrischen Methoden die Cyclovoltammetrie, die SQW-Voltammetrie und die Amperometrie angewendet.

#### 3.1.2.2.1 Cyclovoltammetrie

Cyclovoltammetrie ist ein Sonderfall der Voltammetrie. Im üblichen cyclovoltammetrischen Experiment wird eine stationäre Arbeitselektrode verwendet. Dieser Elektrode wird, ausgehend von einem Ausgangspotential  $E_i$ , ein sich zeitlich linear änderndes Potential  $E(t)$  aufgeprägt, das nach Erreichen eines Umkehrpotentials  $E_\lambda$  wiederum zeitlich linear zum Ausgangswert zurückgeführt wird. Sofern das Standardpotential ( $E^\circ$ ) eines in der Elektrolytlösung vorgelegten elektroaktiven Systems innerhalb des voltammetrisch erfaßten Potentialbereiches liegt, fließt über die Elektrode ein Faradayscher Strom. Wenn sich das Potential in positive Richtung ändert, findet Reduktion, im umgekehrten Fall findet Oxidation der elektroaktiven Substanz statt.

Die wichtigsten Parameter im Cyclovoltammogramm sind also das kathodische bzw. anodische Peakpotential ( $E_{p,c}$ , bzw.  $E_{p,a}$ ), der kathodische bzw. anodische Strom ( $I_{p,c}$  bzw.  $I_{p,a}$ ) und das Mittelpunktspotential ( $E_m$ ). Sie sind wichtig für die Unterscheidung zwischen reversiblen, irreversiblen und quasireversiblen Reaktionen [Heinz 1984, Brett et al. 1993] (siehe Tabelle 6).

Charakteristikum	Reversibel	Irreversibel	Quasireversibel
$I_p$ gegen $v^{1/2}$	linear	linear	nicht-linear
$E_p$ gegen $v^{1/2}$	-	$E_p$ ändert sich mit $v$	$E_p$ ändert sich mit $v$
$E_{p,a} - E_{p,c}$	57/n mV	$E_{p,a}$ oder $E_{p,c}$	$\neq 57/n$ mV
$I_{p,a}/I_{p,c}$	1	$I_{p,a}$ oder $I_{p,c}$	$\neq 1$

**Tabelle 6: Die diagnostischen Parameter für reversible, irreversible und quasireversible Reaktionen. Die Abkürzungen sind im Text erläutert.**

### 3.1.2.2.2 SQW-Voltammetrie

Das Meßprinzip der SQW-Voltammetrie ist das gleiche wie bei der Cyclovoltammetrie. Der einzige Unterschied besteht darin, daß hier derjenige Strom aufgezeichnet wird, der als Differenz zwischen einem vor- und rücklaufenden Puls entsteht. Damit erhält man eine Gesamtstromstärke, die viel höher als der entsprechende Reduktions- bzw. Oxidationsstrom ist. Gleichzeitig ermöglicht diese Technik eine wirksame Unterdrückung des kapazitiven Anteils des zu messenden Stroms. Dadurch läßt sich die Empfindlichkeit um den Faktor  $10^2$  verbessern.

### 3.1.2.2.3 Amperometrie

Während bei der Cyclovoltammetrie in der Regel das Arbeitselektrodenpotential in vorgegebener Weise verändert wird und die damit verbundenen Änderungen im Stromfluß durch die Zelle registriert werden, wird bei der Amperometrie nur der Stromfluß bei einem bestimmten, konstant gehaltenen Potential im Grenzstrombereich (steady-state) gemessen. Man kann aus dem gemessenen Strom gemäß folgender Gleichung auf die Konzentration der reaktiven Spezies schließen [Janata 1989]:

Gleichung 3

$$I_{\text{grenz}} = \frac{n \cdot F \cdot A \cdot D \cdot [C]}{\delta}$$

- $I_{\text{grenz}}$  = Grenzstrom (steady-state-Strom)  
 $n$  = Anzahl der bei der Elektrodenreaktion ausgetauschten Elektronen  
 $F$  = Faradaysche Konstante  
 $D$  = Diffusionskoeffizient  
 $A$  = Fläche der Arbeitselektrode  
 $[C]$  = Konzentration des Analyten  
 $\delta$  = Dicke der Nernstschen Diffusionsschicht

In einem Enzym-gekoppelten System kann der Elektrodenstrom im wesentlichen durch zwei Prozesse begrenzt werden: Die Diffusionsgeschwindigkeit des Substrats in der Lösung und die Geschwindigkeit der Enzymreaktion. Die Systeme folgen meist der Michaelis-Menten-Kinetik. So ergibt sich für eine Enzymelektrode als Elektrodenstrom [Hall 1990]:

Gleichung 4

$$I = \frac{n \cdot F \cdot A \cdot V_{\text{max}} \cdot d \cdot [S]}{2K_M}$$

- $V_{\text{max}}$  = maximale Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion  
 $d$  = Dicke der Diffusionsschicht  
 $[S]$  = Konzentration des Substrats  
 $K_M$  = scheinbare Michaelis-Menten-Konstante  
 Übrige Symbole siehe Gleichung 3

Der gemessene Strom ( $I$ ) im steady-state-Zustand ist direkt proportional der Geschwindigkeit ( $v$ ) der katalytischen Reaktion [Janata 1990]:

Gleichung 5

$$I = \frac{I_{\text{max}}[S]}{K_M + [S]}$$

- Wobei  $I_{\text{max}}$  = maximaler Stromfluß  
 $[S]$  = Konzentration des Substrats

#### **3.1.2.2.4 Elektrolyse**

Die klassische Elektrolyse, d.h. Anlegen eines konstanten Potentials über einen längeren Zeitraum, diente hier dazu, eine Anreicherung des durch Enzymkatalyse gebildeten Metaboliten in der Reaktionsmischung zu erzielen.

#### **3.1.2.2.5 Ermittlung der elektroaktiven Konzentration des Enzyms auf der Elektrode**

Die Integration des Reduktionspeaks, der unter anaeroben Bedingungen mit der Enzymelektrode aufgezeichnet wird, ergibt die bei der Reduktion des Enzyms geflossene Ladungsmenge (Q). Die Konzentration des elektroaktiven Enzyms kann dann unter Annahme eines Ein-Elektrontransfers mit Hilfe der Faradayschen Gleichung ermittelt werden [Greet et al. 1990]:

Gleichung 6

$$Q = m \cdot F$$

m = Menge des elektroaktiven Enzyms (mol)

F = Faradaysche Konstante

#### **3.1.2.2.6 Spektroelektrochemie**

Spektroelektrochemie ermöglicht es, Spektren des Proteins bei verschiedenen Potentialen und somit in verschiedenen Redoxzuständen aufzunehmen, ohne daß die Zugabe von Reduktions- oder Oxidationsmitteln erforderlich ist. Um die Veränderungen des Redoxzustandes des immobilisierten Enzyms spektroskopisch auf der Elektrode während des Reaktionsablaufes zu verfolgen, wird die Reaktion in einer speziellen elektrochemischen Dünnschichtzelle (OTTLE-Zelle) beobachtet [Heineman et al. 1979]. Dadurch besteht die Möglichkeit, das Redoxpotential des Enzyms genau zu berechnen. Die Zelle besteht aus zwei parallel, dicht beieinander angeordneten optisch durchlässigen Quarzscheiben (QS1, QS2), die den Probenraum umschließen (siehe Abbildung 11). Ferner enthält sie eine Drei-Elektroden-Anordnung, wobei die Arbeitselektrode (AE) aus optisch durchlässiger Goldfolie, die Referenzelektrode (RE) aus Ag/AgCl und die Gegenelektrode (GE) aus Platindraht besteht.



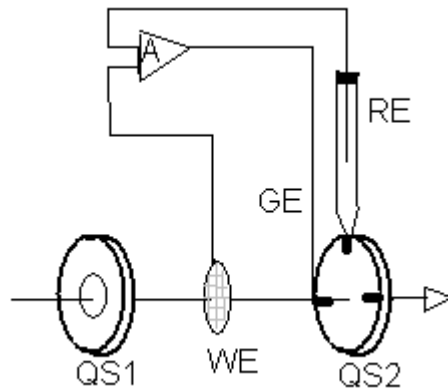


Abbildung 11: Aufbau einer OTTLE-Zelle. A: Verstärker. Abkürzungen siehe Text.

### 3.1.2.3 Spektroskopie

Die UV-Spektroskopie dient als Standardmethode zum Nachweis von P-450. Der intakte, reduzierte Enzym-CO-Komplex zeigt eine charakteristische Absorptionsbande bei 450 nm [Omura et al. 1964a, Omura et al. 1964b]. Dagegen wird bei dem entsprechenden denaturierten Enzym-CO-Komplex eine Bande bei 420 nm beobachtet. Somit läßt sich in einfacher Weise unterscheiden, in welcher Form das Enzym vorliegt.

## 3.2 Experimentelle Durchführung

### 3.2.1 Elektrochemische Untersuchung von CYP3A4 in Lösung

Die Untersuchung von Redoxeigenschaften des Enzyms in der Lösung wurde mittels CV in einer 5 ml Meßzelle durchgeführt. Die Meßlösungen wurden vor dem Versuchsbeginn von Sauerstoff befreit, indem für 15-20 Minuten Argon durch die Zelle durchgeleitet wurde. Als Meßlösung wurde 2  $\mu$ M CYP3A4 in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,4), der 100 mM KCl enthielt, verwendet. Danach wurden CVs in sauerstoffhaltiger Lösung aufgenommen, um den Einfluß des Sauerstoffs auf die elektrochemische Aktivität des Enzyms zu untersuchen.

## **3.2.2 Elektrochemische Untersuchung an CYP3A4-beschichteten Elektroden**

### **3.2.2.1 Elektroaktivität von Analyten und Reagenzien**

Der Faradaysche Strom, der während einer amperometrischen Detektion gemessen wird, kann folgende Ursachen haben:

1. Biokatalyse des Analyten
2. Direkte Reduktion/Oxidation des Analyten an der Oberfläche der Elektrode
3. Eine Kombination aus (1) und (2)

Die Betriebsbedingungen bei Biosensoren sind meistens so gewählt, daß die direkte Reduktion bzw. Oxidation des Analyten an der Elektrode nicht stattfindet oder vernachlässigbar ist. Daher müssen zuerst die elektrochemischen Eigenschaften des Analyten untersucht werden.

Mittels Cyclovoltammetrie wurde das elektrochemische Verhalten der Analyte bzw. der zur Immobilisierung verwendeten Reagenzien untersucht. Die Messungen wurden mit einer GC-, Gold- bzw. Platinelektrode durchgeführt. Die Anfangs- bzw. Endpotentiale betragen 300 mV bzw. -600 mV. Alle Messungen wurden jeweils mit und ohne 1mM des entsprechenden Analyten durchgeführt. Im Falle der Modifizierungsreagenzien wurden Cyclovoltammogramme mit der entsprechenden mit Reagenz beschichteten Elektrode aufgenommen. Die Scanrate bei allen Experimenten betrug 100 mV/s gegen Ag/AgCl.

### **3.2.2.2 Indirekter Elektronentransfer zu CYP3A4**

#### **3.2.2.2.1 Redoxeeigenschaften der Mediatoren**

Als ein anderer Ansatzpunkt neben dem Konzept des direkten Elektronentransfers diente der Einsatz von Mediatoren. Als solche wurden Kobaltsepulchrat, Neutralrot und Ferrocenmonocarbonsäure verwendet. Ferner wurde der Einsatz von elektrochemisch abgelagertem Polypyrrol bzw. Polythiophenessigsäure in Hinsicht auf seine Mediatorfähigkeit untersucht.

Die Charakterisierung der elektrochemischen Eigenschaften der Mediatoren erfolgte durch CV-Experimente in einer 20 ml Meßzelle. Dafür wurden zuerst CVs der niedermolekularen Mediatoren mit einer blanken GC-Elektrode in entsprechender

1mM Mediatorlösung (50 mM Phosphatpuffer, 100 mM KCl, Scanrate 50 mV/s) aufgenommen. Zusätzlich wurden CVs mit enzymbeschichteten GC- bzw. Platinelektroden aufgezeichnet. Im Falle der Polymere wurden Cyclovoltammogramme mit Polymer-Enzym-beschichteten Elektroden unter gleichen Bedingungen aufgenommen. Die gewählten Anfangs- bzw. Endpotentiale für die verschiedenen Mediatoren deckten dabei den jeweiligen redoxaktiven Bereich ab. Daraus wurden die elektrochemischen Parameter, nämlich der Quotient aus kathodischem und anodischem Strom ( $I_{p,a}/I_{p,c}$ ) und die Redoxpotentiale ( $E_{p,a}; E_{p,c}$ ) entnommen. Die Aufzeichnung der CVs erfolgte auch in aerobem Medium, um die mögliche Beeinflussung der Redoxeigenschaften durch Sauerstoff aufzuklären.

### **3.2.2.2 Katalytische Eigenschaften der Mediatoren**

CV-Messungen wurden auch durchgeführt, um die Fähigkeit der Mediatoren für den notwendigen Elektronentransfer zwischen Elektrode und Enzym zu untersuchen. Für die Experimente wurden Enzym-beschichtete GC- bzw. Pt-Elektroden verwendet. Für die Untersuchung der möglichen Mediatorfähigkeit von Polypyrrol bzw. Polythiophenessigsäure kamen die Polymer-Enzym-beschichteten Elektroden zum Einsatz. Die Aufzeichnung der Strom-Spannungs-Kurven erfolgte im entsprechenden Potentialbereich für die Mediatoren sowohl mit als auch ohne Substrat (Verapamil). Alle Messungen wurden unter gleichen experimentellen Bedingungen aufgenommen; sofern Substrat zum Einsatz kam, war auch Sauerstoff gegenwärtig.

### **3.2.2.3 Direkter Elektronentransfer zu CYP3A4**

#### **3.2.2.3.1 Elektroaktivität des CYP3A4**

##### **3.2.2.3.1.1 Cyclovoltammetrie**

Cyclovoltammogramme mit unterschiedlich beschichteten CYP3A4-Elektroden wurden aufgenommen. Die Messungen wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Vor dem Beginn der Experimente wurde die Meßlösung durch Einleiten von Argon für 20 Minuten von Sauerstoff befreit. Das gewählte Potentialfenster lag zwischen 300 mV und -800 mV. Auch hier kamen Ag/AgCl- bzw. Pt-Elektroden als Referenz- bzw. Gegenelektroden zum Einsatz. Aus den Cyclovoltammogrammen wurden die Redoxpotentiale und die dazugehörige Stromstärke abgelesen. Daraus wurde das formale Potential ( $E^\circ$ ) des Enzyms als Mittelpunkt zwischen dem Reduktions- und Oxidationspotential (sog. Mittelpunktspotential,  $E_m$ ) errechnet (siehe Gleichung 7).

Gleichung 7

$$E_m = \frac{1}{2}(E_{p,a} + E_{p,c})$$

- $E_{p,a}$  = Oxidationspotential  
 $E_{p,c}$  = Reduktionspotential  
 $E_m$  = Mittelpunktspotential

**3.2.2.4 Katalytische Aktivität des CYP3A4****3.2.2.4.1 Cyclovoltammetrie**

CV-Experimente wurden auch zur Untersuchung der katalytischen Eigenschaften der Enzymelektroden durchgeführt. Dazu wurden die Strom-Spannungs-Kurven mit verschiedenen beschichteten Enzymelektroden im Potentialbereich zwischen 200 mV und -600 mV sowohl mit als auch ohne Substrat aufgenommen. Die Messungen erfolgten mit Vorschubgeschwindigkeiten von 200 mV/s, 100 mV/s bzw. 10 mV/s. Sofern mit Substrat gearbeitet wurde, war auch immer Sauerstoff gegenwärtig. Die sonstigen experimentellen Bedingungen waren identisch mit denen der obengenannten Versuche. Zur Charakterisierung des katalytischen Vermögens der Biosensoren wurde der jeweilige Quotient aus dem Reduktionsstrom ( $I_{red,S}$ ), der in Anwesenheit von Substrat zu beobachten war, und dem Reduktionsstrom ( $I_{red}$ ), der in Abwesenheit von Substrat zu beobachten war, berechnet.

**3.2.2.4.2 Amperometrie**

Elektroden, bei denen mittels Cyclovoltammetrie eine Elektroaktivität des Enzyms festgestellt werden konnte, wurden mit Amperometrie auf ihre katalytischen Eigenschaften hin untersucht. Nach Anlegen einer konstanten Spannung an der Arbeitselektrode in der von Sauerstoff befreiten Lösung wurde abgewartet, bis der Umschaltstrom einen stationären Wert erreichte. Nach Einleiten von 10 ml Sauerstoff in die Lösung wurde das Substrat (Verapamil) sukzessive der Meßlösung zugegeben. Vom gemessenen Strom wurde der Betrag des Hintergrundstroms abgezogen, um den substratkonzentrationsabhängigen Strom zu erhalten. Damit wurde sichergestellt, daß der gemessene Strom das Resultat eines ausschließlich faradayschen Prozesses an der Enzymelektrode war.

### **3.2.3 Charakterisierung von CYP3A4-Polyion-Filmen**

#### **3.2.3.1 Filmwachstum**

Das Filmwachstum wurde aus der Massenzunahme nach jedem Adsorptionsschritt bestimmt. Dabei wurde die Frequenzänderung der MPS-modifizierten Goldelektrode nach jedem Polyanion- bzw. Enzym-Adsorptionsschritt registriert. Die Massenänderung ( $\Delta M$ ) bei der Adsorption wurde aus der entsprechenden Frequenzänderung ( $\Delta F$ ) mit Hilfe der Sauerbrey-Gleichung berechnet (siehe Gleichung 1).

#### **3.2.3.2 Spektroskopische und spektroelektrochemische Eigenschaften**

##### **3.2.3.2.1 Spektroskopische Eigenschaften**

Zunächst wurde ein Absorptionsspektrum des CYP3A4 in Suspension (1 mg/ml) aufgenommen. Anschließend wurde das Enzym durch Zugabe einer Spatelspitze Natriumdithionit reduziert und erneut ein Absorptionsspektrum aufgenommen [Omura et al. 1964a]. Nach Einleiten von CO (5 Minuten) zum reduzierten Enzym erfolgte erneut die Aufnahme eines Absorptionsspektrums.

Die obengenannten Versuche wurden auch mit optisch durchlässiger, Enzymfilm-beschichteter Dünnschicht-Goldelektrode in einer OTTLE-Zelle wiederholt.

##### **3.2.3.2.2 Spektroelektrochemische Eigenschaften**

Um die Veränderungen des Redoxzustandes des immobilisierten Enzyms spektroskopisch auf der Elektrode während des Reaktionsablaufs zu verfolgen, wurde die Reaktion in einer OTTLE-Zelle (400  $\mu$ l), die mit einer optisch durchlässigen mit Enzymfilm-beschichteten Dünnschicht-Goldelektrode versehen war, beobachtet. Dabei wurden an der Elektrode verschiedene Potentiale (100 mV, 200 mV, 0 mV, -200 mV, -300 mV, -400 mV, -500 mV) angelegt und die entsprechenden Absorptionsspektren aufgenommen.

Die Durchführung der spektroelektrochemischen Messungen erfolgte im Arbeitskreis Priv.-Doz. Dr. Thomas Link (Universitätsklinikum Frankfurt, Institut für Biochemie und Molekulare Bioenergetik).

### **3.2.3.3 Redoxaktivität**

#### **3.2.3.3.1 *Cyclovoltammetrie***

Die Redoxaktivität von einfach bzw. 5-fach beschichteten CYP3A4-Elektroden wurde wie oben beschrieben mittels Cyclovoltammetrie untersucht. Mit der Enzymelektrode wurden Cyclovoltammogramme bei verschiedenen Scangeschwindigkeiten aufgezeichnet, um die Reversibilität des Elektronentransfers zu untersuchen. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den in Abschnitt 3.2.2.3.1.1 beschriebenen.

#### **3.2.3.3.2 *SQW-Voltammetrie***

Die Redoxaktivität der CYP3A4-Elektrode wurde auch mittels SQW-Voltammetrie untersucht. Dabei wurden SQW-Voltammogramme bei verschiedenen Frequenzen aufgezeichnet. Die Reaktionsbedingungen waren die gleichen wie bei den CV-Experimenten (siehe Abschnitt 3.2.2.3.1.1).

#### **3.2.3.4 Einfluß von CO auf die Redoxeigenschaften der CYP3A4-Elektrode**

Cyclovoltammogramme wurden zuerst bei 100 mV/s in einem Potentialfenster von 200 mV bis –600 mV unter anaeroben Bedingungen aufgenommen. Die Meßlösung wurde anschließend mit CO gesättigt (5 min Einleiten). Erneut wurde ein Cyclovoltammogramm mit der Enzymelektrode in CO-gesättigter Lösung aufgezeichnet. Die sonstigen Versuchsbedingungen entsprachen den unter Abschnitt 3.2.2.3.1.1 genannten.

#### **3.2.3.5 Einfluß des pH-Wertes auf die Redoxeigenschaften der CYP3A4-Elektrode**

Um den Einfluß des pH-Wertes auf die Redoxeigenschaften des Films zu bestimmen, wurde die Strom-Spannungskurve der Elektrode in Phosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten (4,5; 5,0; 5,5; 6,5; 7,0; 7,4; 8,0 und 8,5) gemessen. (Versuchsbedingungen siehe Abschnitt 3.2.2.3.1.1).

### **3.2.3.6 Katalytische Aktivität**

Die Untersuchung der katalytischen Aktivität der Enzymfilme erfolgte mittels Cyclovoltammetrie und Amperometrie. Die Vorgehensweisen und die Versuchsbedingungen waren mit den in Abschnitt 3.2.2.4 beschriebenen identisch.

### **3.2.3.7 Effekte der Inhibitoren auf die katalytische Aktivität der CYP3A4-Elektrode**

#### **3.2.3.7.1 Cyclovoltammetrie**

Unter den oben beschriebenen experimentellen Bedingungen wurden bei einer konstanten Substratkonzentration CVs bei 100 mV/s bzw. 10 mV/s aufgenommen. Anschließend wurden nach Zugabe von Ketoconazol, einem Inhibitor des CYP3A4-Enzyms, bei unterschiedlichen Konzentrationen CVs aufgezeichnet. CO wurde ebenfalls als Inhibitor eingesetzt. Dazu wurden CVs nach Einleiten von CO aufgenommen. Aus den entsprechenden CVs wurden dann die Änderungen des Reduktionsstroms berechnet.

#### **3.2.3.7.2 Amperometrie**

Verapamil wurde in Phosphatpuffer in Gegenwart von Sauerstoff in einer Konzentration von 2 mM vorgelegt. An der CYP3A4-Elektrode wurde ein Potential von  $-450$  mV angelegt. Sobald der Reduktionsstrom einen konstanten Wert erreicht hatte, wurden 2 mM Ketoconazol der Meßlösung sukzessiv (200  $\mu$ M) zugegeben und die dazugehörigen Strom-Zeit-Kurven aufgezeichnet.

### **3.2.3.8 Überprüfung der katalytischen Aktivität durch Elektrolyse**

Um die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich der katalytischen Aktivität des Enzymfilms zu überprüfen, wurde eine Serie von Elektrolysen mit CYP3A4-Elektroden ( $2,2 \text{ cm}^2$ ;  $-500$  mV) in einer 4 ml Zelle in Gegenwart von Verapamil (500  $\mu$ M) über einen längeren Zeitraum (3 Stunden, 2 Stunden, 40 Minuten) durchgeführt. Während der Elektrolyse war die Zelle offen. Die Metabolitenbildung wurde mittels LC-MS bestimmt [von Richter et al. 2000]. Parallel dazu wurde zur Kontrolle eine Elektrolyse (3 Stunden) mit einer Elektrode ohne Enzym-Beschichtung in Gegenwart von Verapamil (in An- und Abwesenheit von Sauerstoff) durchgeführt.

Die Analytik der Verapamilmetabolite wurde im Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie, Stuttgart durchgeführt.

### **3.2.4 Charakterisierung der ablaufenden Reaktionen**

#### **3.2.4.1 Zeitlicher Verlauf der Metabolitenbildung**

Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Metabolitenbildung wurden während der Elektrolyse Proben zu verschiedenen Zeitpunkten aus der Meßzelle entnommen und mittels LC-MS analysiert [von Richter et al. 2000]. Die Versuchsbedingungen entsprachen den unter Abschnitt 3.2.3.8 angegebenen.

#### **3.2.4.2 Einfluß des Inhibitors (Ketoconazol) auf die Metabolitenbildung**

Die unter Abschnitt 3.2.3.8 beschriebene Elektrolyse von Verapamil (500 µM) an einer CYP3A4-Elektrode wurde in Anwesenheit von 500 µM Ketoconazol durchgeführt. Die Proben wurden nach 40 und 60 Minuten entnommen und mittels LC-MS analysiert, um die Wirkung des Ketoconazols auf die Metabolitenbildung zu untersuchen.

#### **3.2.4.3 Einfluß des Superoxids auf die Metabolitenbildung**

Die Elektrolyse von Verapamil wurde bei –500 mV an einer CYP3A4-Elektrode in Anwesenheit von Superoxiddismutase (700 ng/ml) durchgeführt. Als Versuchsbedingungen wurden die unter Abschnitt 3.2.3.8 genannten gewählt. Nach 40 und 60 Minuten wurden Proben entnommen und mittels LC-MS analysiert.

#### **3.2.4.4 Einfluß des Wasserstoffperoxids auf die Metabolitenbildung**

Die unter Abschnitt 3.2.3.8 beschriebene Elektrolyse von Verapamil (500 µM) an einer CYP3A4-Elektrode wurde in Gegenwart von Katalase (300 units) durchgeführt. Die Proben wurden nach 40 und 60 Minuten entnommen und mittels LC-MS analysiert, um die mögliche Beteiligung des Wasserstoffperoxids an der Metabolitenbildung zu untersuchen. Ferner wurde eine Inkubation von 500 µM Verapamil mit 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Gegenwart einer CYP3A4-Elektrode ohne angelegtes Potential durchgeführt. Um festzustellen, ob eine mögliche Umsetzung von Verapamil mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auch ohne Gegenwart von CYP3A4 stattfindet, erfolgte eine weitere Inkubation nur mit Verapamil und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



### **3.2.4.5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung und Sauerstoffverbrauch**

Um die mögliche Bildung des Wasserstoffperoxids bei der Katalyse zu untersuchen, wurde eine Elektrolyse (1Stunde) zunächst in Phosphatpuffer an blanker Elektrode durchgeführt. Dabei wurde der Sauerstoffverbrauch mittels Clark-Elektrode (TSE GmbH, Bad Homburg) und die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mittels Quantofix–Stäbchen (Macherey-Nagel, Düren) bestimmt. Anschließend wurde die gleiche Elektrolyse mit einer CYP3A4-Elektrode in An- bzw. Abwesenheit von Verapamil (500 µM) wiederholt. In beiden Fällen wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung und der Sauerstoffverbrauch bestimmt.

### **3.2.5 Ergänzende Untersuchung der katalytischen Eigenschaften der CYP3A4-Elektrode mit weiteren CYP3A4-Substraten**

Die Validierung der CYP3A4-Elektrode erfolgte mit weiteren Substraten des Enzyms. Dazu wurde die katalytische Aktivität der Enzymelektrode mittels Cyclovoltammetrie und Amperometrie für Midazolam, Progesteron und Chinidin untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte für die Cyclovoltammetrie wie unter Abschnitt 3.2.2.4.1 und für die Amperometrie wie unter Abschnitt 3.2.2.4.2 beschrieben. Im Falle von Midazolam wurde zusätzlich eine Elektrolyse durchgeführt und die entstandenen Produkte mittels LC-MS analysiert. Ferner wurden auch der jeweilige Einfluß von Ketoconazol, Superoxid und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Metabolitenbildung untersucht. Dabei entsprachen die gewählten Versuchsbedingungen den unter den Abschnitten 3.2.4.2, 3.2.4.3 bzw. 3.2.4.4 genannten.

Die Analytik der Midazolam-Metabolite wurde bei der Bayer AG, Abt. Metabolismus und Isotopenchemie, Wuppertal durchgeführt.

### 3.2.6 Kinetische Parameter

Die kinetischen Parameter für die elektrochemisch gesteuerte Enzymkatalyse wurden mit Hilfe linearer Regression (Programm Microcal™ Origin™ 5.0, Microcal Software, Northampton, USA) nach der Michaelis-Menten-Gleichung [Michaelis et al. 1913] ermittelt:

Gleichung 8

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

mit:

$V_{\max}$ bzw. $I_{\max}$	= maximale Reaktionsgeschwindigkeit
$K_M$	= Michaelis-Menten-Konstante
$[S]$	= Substratkonzentration

Dabei wurden die gemessenen, der jeweiligen Substratkonzentration zugehörigen Reduktionsströme als ( $v$ ) angegeben. Die graphischen Darstellungen basieren sowohl auf dem Michaelis-Menten- als auch auf dem Hanes-plot.

### 3.2.7 Übertragung der Methoden auf CYP2D6

Die Redoxeigenschaften des CYP2D6-Films wurden analog zu den CYP3A4-Elektroden mittels Cyclovoltammetrie und SQW-Voltammetrie, die katalytischen Eigenschaften mittels Cyclovoltammetrie und Amperometrie untersucht. Als Substrat wurde Dextromethorphan verwendet.

#### 3.2.7.1 Cyclovoltammetrie

Es wurden Cyclovoltammogramme im Potentialbereich zwischen 200 mV und –700 mV bei verschiedenen Scangeschwindigkeiten aufgenommen. Die Aufnahme der Voltammogramme erfolgte im anaeroben Medium. Sonstige Versuchsbedingungen entsprachen den unter 3.2.3.3 genannten. Zur Charakterisierung des Redoxverhaltens wurden die elektrochemischen Parameter ( $\Delta E_p$ ,  $I_{p,c}$ ,  $I_{p,a}$ ) aus den Voltammogrammen entnommen. Zur Untersuchung der katalytischen Fähigkeit der Elektrode wurden zunächst CVs nach Einleiten einer bestimmten Menge Sauerstoffs (10 ml) aufgezeichnet. Schließlich wurden schrittweise jeweils 20  $\mu$ l 10 mM Dextromethorphan (entspricht 10  $\mu$ M Gesamtkonzentration in der Meßlösung) in die

Meßlösung zugegeben und erneut nach jeder Zugabe die entsprechenden Strom-Spannungs-Kurven aufgenommen.

### **3.2.7.2 SQW-Voltammetrie**

Die Redoxaktivität der CYP2D6-Elektrode wurde auch mittels SQW-Voltammetrie untersucht. Dabei wurden SQW-Voltammogramme bei verschiedenen Frequenzen aufgezeichnet. Die Aufnahme der Voltammogramme erfolgte im anaeroben Medium im Potentialbereich zwischen 200 mV und -700 mV. Die sonstigen Reaktionsbedingungen waren die gleichen wie bei den CV-Experimenten (siehe Abschnitt 3.2.2.3.1.1).

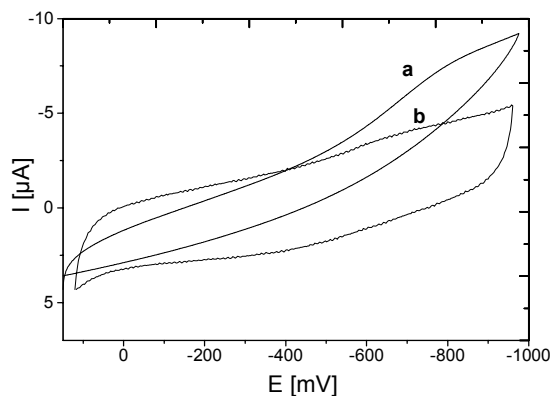
### **3.2.7.3 Amperometrie**

Bei der Amperometrie wurde an der Elektrode ein Potential von -600 mV angelegt. Die sonstigen Versuchsbedingungen entsprachen den unter Abschnitt 3.2.3.4 beschriebenen. Es wurden in konstanten Zeitintervallen Portionen von 20 µl 10 mM Dextromethorphan (entspricht 10 µM in der Meßzelle) sukzessiv bis zu einer Konzentration von 80 µM und dann weiter in Portionen von 40 µl bis zu einer Endkonzentration von 120 µM der Meßlösung zugegeben und die zugehörige Strom-Zeit-Kurve aufgezeichnet. Aus der aufgezeichneten Kurve wurde anschließend die konzentrationsabhängige Stromänderung abgelesen.

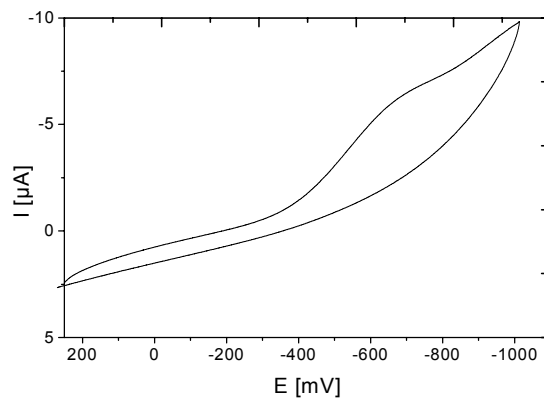
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Elektrochemische Untersuchung von CYP3A4 in Lösung

Die Redoxfähigkeit des CYP3A4-Enzyms in der Lösung wurde mittels Cyclovoltammetrie untersucht. Es wurden mit der GC-Elektrode keine Redoxpeaks detektiert. Dagegen war mit der Au-Elektrode ein schwacher Oxidationspeak bei -300 mV (gegen Ag/AgCl) zu erkennen. In Gegenwart von Sauerstoff wurde ein Reduktionspeak bei ca. -700 mV beobachtet. Folgende Abbildungen (12 und 13) zeigen die entsprechenden, mit der GC-Elektrode aufgezeichneten Cyclovoltammogramme.



**Abbildung 12: Cyclovoltammogramm einer GC- (a) bzw. Au-Elektrode (b) in 2 µM CYP3A4 in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl (pH=7,4). Scanrate: 100 mV/s.**



**Abbildung 13: Cyclovoltammogramm einer GC-Elektrode in 2 µM CYP3A4 in sauerstoffhaltigem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl (pH=7,4). Scanrate: 100 mV/s.**

## 4.2 Elektrochemische Untersuchung an CYP3A4-beschichteten Elektroden

### 4.2.1 Elektroaktivität von Analyten und Reagenzien

#### 4.2.1.1 Cyclovoltammetrie

Cyclovoltammetrie wurde zur Analyse der Redoxeigenschaften der Analyte angewendet. Die untersuchten Analyte bzw. Reagenzien zeigten kein Redoxverhalten im für den Biosensor wichtigen Potentialbereich zwischen 200 mV und -800 mV (s. Tabelle 7).

Substanz	Potentialfenster [mV] gegen Ag/AgCl	Medium	Elektrode	Redox- aktivität
Cystamin	200 bis -800	aerob	Au	keine
Cystamin	300 bis -800	anaerob	Au	keine
Mercaptoanilin	200 bis -800	aerob	Au	keine
Mercaptoanilin	200 bis -800	anaerob	Au	keine
Dithiopyridin	200 bis -800	aerob	Au/Pt	keine
Dithiopyridin	200 bis -800	anaerob	Au/Pt	keine
N-Acetylcystein	200 bis -800	aerob	Au	keine
N-Acetylcystein	200 bis -800	anaerob	Au	keine
DDAB	200 bis -800	aerob	PG/GC/Pt	keine
DDAB	200 bis -800	anaerob	PG/PT/GC	keine
DHP	200 bis -800	aerob	PG/PT/GC	keine
DHP	200 bis -800	anaerob	PG/PT/GC	keine
DMPC	200 bis -800	aerob	PG/PT/GC	keine
DMPC	200 bis -800	anaerob	PG/PT/GC	keine
DLPC	200 bis -800	aerob	PG/PT/GC	keine
DLPC	200 bis -800	anaerob	PG/PT/GC	keine
Chloranil	200 bis -800	aerob	Pt/ ITO	keine
Chloranil	200 bis -800	anaerob	Pt/ ITO	keine

Tabelle 7: Elektrochemisches Verhalten der verwendeten Reagenzien im gewählten Potentialfenster.

## 4.2.2 Indirekter Elektronentransfer zu CYP3A4

### 4.2.2.1 Redoxeigenschaften der Mediatoren

Aus den Cyclovoltammogrammen der entsprechenden Mediatoren, die mit blanker und Enzym-beschichteter Elektrode aufgezeichnet wurden, wurden die zugänglichen elektrochemischen Parameter, nämlich der Quotient aus kathodischem und anodischem Strom ( $I_{p,a}/I_{p,c}$ ) und die Redoxpotentiale ( $E_{p,a};E_{p,c}$ ) entnommen. Alle in den folgenden Tabellen (8 bis 14) angegebenen Redoxpotentiale wurden gegen Ag/AgCl bestimmt.

#### 1) Niedermolekulare Mediatoren:

##### A. Auf blanker GC-Elektrode

Mediatoren	$E_{red.}$ [mV]	$E_{ox.}$ [mV]	$I_{red.}$ [ $\mu$ A]	$I_{ox.}$ [ $\mu$ A]	$I_{red.}/I_{ox.}$ [ $\mu$ A]
Ferrocenmonocarbonsäure	280	375	39,2	42,1	0,93
Neutralrot	-605	-550	36,9	22,3	1,65
Kobaltsepulchrat	-622	-571	15,4	13,8	1,12

Tabelle 8: Elektrochemische Parameter der verwendeten Mediatoren auf der blanken GC-Elektrode.

##### B. Auf Enzym-beschichteter Elektrode

Im Falle von Kobaltsepulchrat wurde auf der Enzym-beschichteten GC- bzw. PG-Elektrode mit fortschreitender Zeit eine unregelmäßige Stromänderung beobachtet.

#### 1a. GC-BSA-GA-CYP3A4 im anaeroben Medium

Mediatoren	$E_{red.}$ [mV]	$E_{ox.}$ [mV]	$I_{red.}$ [ $\mu$ A]	$I_{ox.}$ [ $\mu$ A]	$I_{red.}/I_{ox.}$ [ $\mu$ A]
Ferrocenmonocarbonsäure	278	-373	8,9	9,7	0,92
Neutralrot	-605	-550	28,6	19,3	1,48
Kobaltsepulchrat	-625	-568	9,6	8,8	1,09

Tabelle 9: Elektrochemische Parameter der verwendeten Mediatoren auf der GC-BSA-GA-CYP3A4-Elektrode im anaeroben Medium.

### 1b. GC-BSA-GA-CYP3A4 im aeroben Medium

Mediatoren	$E_{red.}$ [mV]	$E_{ox.}$ [mV]	$I_{red.}$ [ $\mu$ A]	$I_{ox.}$ [ $\mu$ A]	$I_{red./I_{ox.}}$ [ $\mu$ A]
Ferrocenmonocarbonsäure	274	373	9,1	9,6	0,95
Neutralrot	-585	-557	27,4	19,4	1,26
Kobaltsepulchrat	-638	-555	25	8,6	2,9

Tabelle 10: Elektrochemische Parameter der verwendeten Mediatoren auf der GC-BSA-GA-CYP3A4 –Elektrode im aeroben Medium.

### 2a. PG-DDAB-CYP3A4 im anaeroben Medium

Mediatoren	$E_{red.}$ [mV]	$E_{ox.}$ [mV]	$I_{red.}$ [ $\mu$ A]	$I_{ox.}$ [ $\mu$ A]	$I_{red./I_{ox.}}$ [ $\mu$ A]
Ferrocenmonocarbonsäure	278	-373	8,9	9,7	0,92
Neutralrot	-605	-550	28,6	19,3	1,48
Kobaltsepulchrat	-625	-568	9,3	7,9	1,23

Tabelle 11: Elektrochemische Parameter der verwendeten Mediatoren auf der PG-DDAB-CYP3A4–Elektrode im anaeroben Medium.

### 2b. PG-DDAB-CYP3A4 im aeroben Medium

Mediatoren	$E_{red.}$ [mV]	$E_{ox.}$ [mV]	$I_{red.}$ [ $\mu$ A]	$I_{ox.}$ [ $\mu$ A]	$I_{red./I_{ox.}}$ [ $\mu$ A]
Ferrocenmonocarbonsäure	275	375	8,8	9,3	0,95
Neutralrot	-585	-554	30,1	10,8	2,78
Kobaltsepulchrat	-625	-568	24,2	7,05	3,43

Tabelle 12: Elektrochemische Parameter der verwendeten Mediatoren auf der PG-DDAB-CYP3A4–Elektrode im aeroben Medium.

## 2) Leitfähige Polymere

### a. Pt-Polymer-CYP3A4 im anaeroben Medium:

Mediatoren	$E_{\text{red.}}$ [mV]	$E_{\text{ox.}}$ [mV]	$I_{\text{red.}}$ [ $\mu\text{A}$ ]	$I_{\text{ox.}}$ [ $\mu\text{A}$ ]	$I_{\text{red.}}/I_{\text{ox.}}$ [ $\mu\text{A}$ ]
Polypyrrol	-605	-490	20	22	0,91
Polythiophenessäure	-625	-600	16	~5	3,2

Tabelle 13: Elektrochemische Parameter der Pt-Polymer-CYP3A4–Elektrode im anaeroben Medium.

### b. Pt-Polymer-CYP3A4 im aeroben Medium:

Mediatoren	$E_{\text{red.}}$ [mV]	$E_{\text{ox.}}$ [mV]	$I_{\text{red.}}$ [ $\mu\text{A}$ ]	$I_{\text{ox.}}$ [ $\mu\text{A}$ ]	$I_{\text{red.}}/I_{\text{ox.}}$ [ $\mu\text{A}$ ]
Polypyrrol	-608	-494	22	21	1,05
Polythiophenessäure	-625	-600	19	~5	3,8

Tabelle 14: Elektrochemische Parameter der Pt-Polymer-CYP3A4–Elektrode im aeroben Medium.

#### 4.2.2.2. Katalytische Eigenschaften der Mediatoren

Die folgenden Tabellen (15 und 16) fassen die Ergebnisse der Untersuchungen zu den katalytischen Fähigkeiten der eingesetzten Mediatoren zusammen. Im Falle von Kobaltsepulchrat wurde ein Anstieg des Reduktionspeaks in Gegenwart von Verapamil beobachtet. Während in ausschließlicher Anwesenheit von Sauerstoff der Reduktionsstrom 24,2  $\mu\text{A}$  betrug, wurde bei der Zugabe von Substrat ein Reduktionsstrom von 34  $\mu\text{A}$  mit der PG-DDAB-CYP3A4-Elektrode in der Kobaltsepulchrat-Lösung registriert (siehe Abbildung 14).



## 1. Niedermolekulare Mediatoren:

Mediator	Elektrode	Methode	$I_{red,S}/I_{red}$	Hinweis auf katalytische Aktivität	Anmerkungen
Ferrocenmonocarbonsäure	GC-BSA-GA-CYP3A4	CV	~1	keine	-
	PG-DDAB-CYP3A4	CV	~1	keine	-
Neutralrot	GC-BSA-GA-CYP3A4	CV	~1	keine	-
	PG-DDAB-CYP3A4	CV	~1	keine	-
Kobaltsepulchrat	GC-BSA-GA-CYP3A4	CV	~3,5	nicht eindeutig	Unregelmäßig
	PG-DDAB-CYP3A4	CV	~3,5	nicht eindeutig	Unregelmäßig

Tabelle 15: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen über die katalytischen Fähigkeiten der Mediator-Enzym-Systeme.

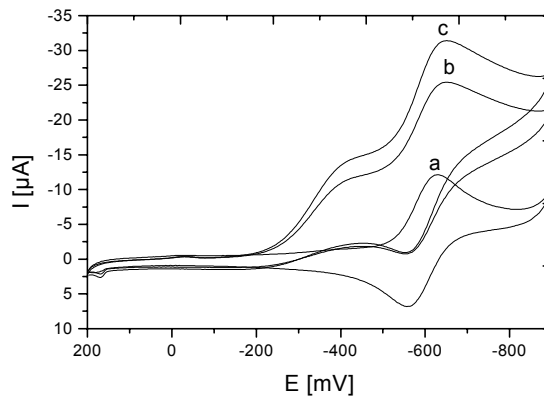


Abbildung 14: Cyclovoltammogramme von Kobaltsepulchrat an einer PG-DDAB-CYP3A4-Elektrode in (a) sauerstofffreiem, (b) sauerstoffhaltigem (c) sauerstoff- und substrathaltigem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl (pH=7,4). Scanrate: 100 mV/s.

## 2. Leitfähige Polymere:

Elektrode	Methode	$I_{red,S}/I_{red}$	Hinweis auf katalytische Aktivität	Anmerkungen
PT-Polypyrrol-CYP3A4	CV	~1	keine	-
PT-Polythiophen-essigsäure-CYP3A4	CV	~1	keine	-

Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen über die katalytischen Fähigkeiten der Mediator (Polymer)-Enzym-Systeme.

### 4.2.3 Direkter Elektronentransfer zu CYP3A4

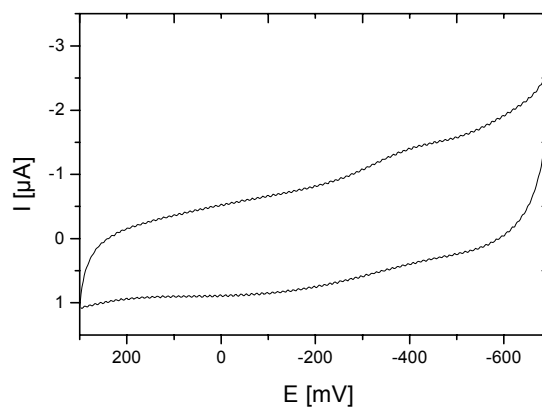
#### 4.2.3.1 Elektroaktivität des CYP3A4

Die voltammetrischen Experimente mit verschiedenen hergestellten Enzymelektroden zeigten eine sehr unterschiedliche Elektroaktivität für Cytochrom P-450 Enzyme. Die Ergebnisse der CV sind in den Tabellen 17 bis 21 zusammengefaßt. Die Cyclovoltammogramme, in denen ein Elektronentransfer zu erkennen ist, sind zusätzlich abgebildet.

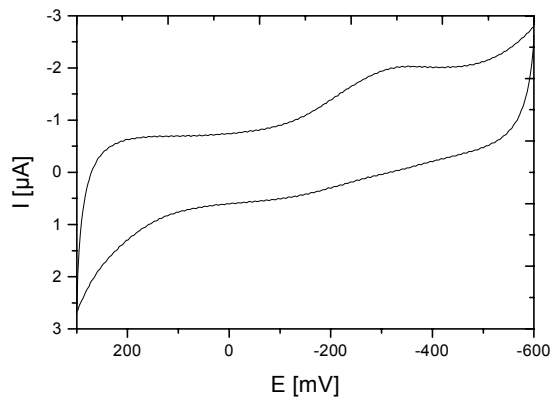
**PG-Elektrode:**

<b>Modifizierung mit</b>	<b>Potentialfenster [mV]</b>	<b>Redoxsignale [mV] gegen Ag/AgCl</b>
BSA-GA	0 bis -700	schwache Redoxpeaks bei -380/-180 mV
Laurinsäure-BSA-GA	0 bis -700	keine Redoxpeaks
DDAB	100 bis -800	sehr schwache Redoxpeaks bei -370 mV/-250 mV, verschwanden nach ca. 20-30 Minuten
BSA-GA-DDAB	100 bis -800	sehr schwache Redoxpeaks bei -370 mV/-250 mV, verschwanden nach ca. 20-30 Minuten
DMPC	0 bis -600	sehr schwache Redoxpeaks bei -360 mV/-260 mV, verschwanden nach ca. 20-30 Minuten
BSA-GA-DMPC	0 bis -600	sehr schwache Redoxpeaks bei -400 mV/-240 mV, verschwanden nach ca. 20-30 Minuten
DHP	100 bis -600	keine Redoxpeaks
DLPC	100 bis -600	keine Redoxpeaks
Diaminoethan	0 bis -500	sehr schwacher Reduktionspeak bei -300 mV
Polylysin	200 bis -600 mV	Redoxpeaks bei -260 mV/-160 mV

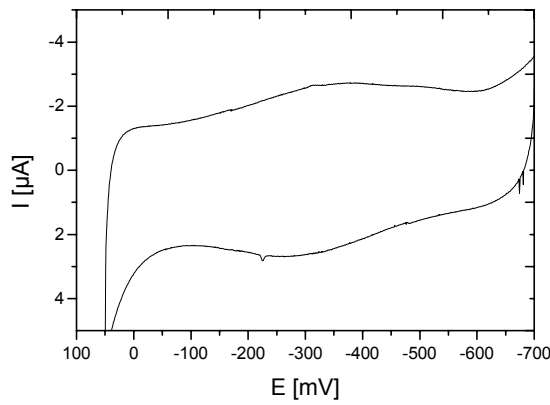
**Tabelle 17: Zusammenfassung der Ergebnisse der Cyclovoltammetrie für verschieden modifizierte CYP3A4-PG-Elektroden.**



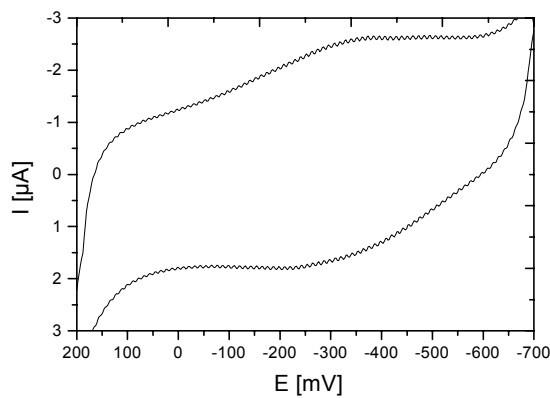
**Abbildung 15: Cyclovoltammogramm einer PG-BSA-GA-CYP3A4-Elektrode in sauerstoffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s.**



**Abbildung 16:** Cyclovoltammogramm einer PG-DAE-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s.



**Abbildung 17:** Cyclovoltammogramm einer PG-DDAB-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s.



**Abbildung 18:** Cyclovoltammogramm einer PG-DMPC-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s.

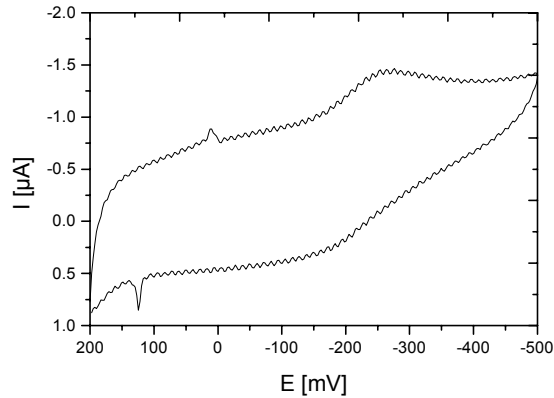
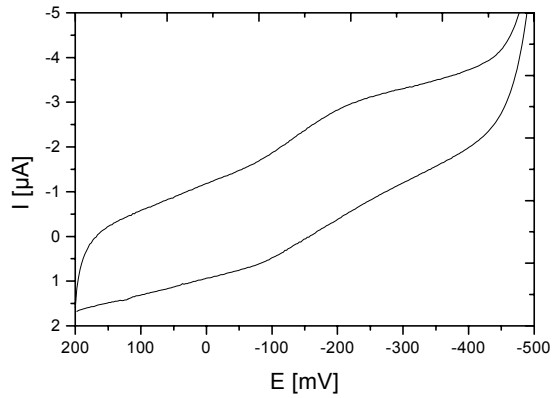


Abbildung 19: Cyclovoltammogramm einer PG-PLL-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s.

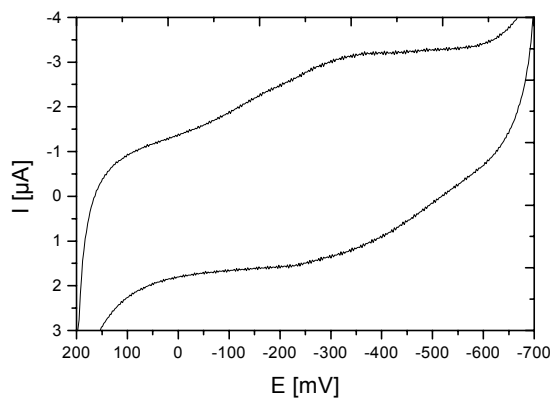
### 3) GC-Elektrode:

Modifizierung mit	Potentialfenster [mV]	Redoxsignale [mV] gegen Ag/AgCl
BSA-GA	200 bis -500	schwache Redoxpeaks bei -370/-170 mV
DDAB	200 bis -700	sehr schwache Redoxpeaks bei -400 mV/-210 mV, verschwanden nach ca. 20-30 Minuten
BSA-GA-DDAB	200 bis -700	sehr schwache Redoxpeaks bei -400 mV/-210 mV, verschwanden nach ca. 20-30 Minuten
DMPC	200 bis -800	sehr schwache Redoxpeaks bei -380 mV/-210 mV, verschwanden nach ca. 20-30 Minuten
BSA-GA-DMPC	200 bis -800	sehr schwache Redoxpeaks bei -400 mV/-210 mV, verschwanden nach ca. 20-30 Minuten
DLPC	100 bis - 600	keine Redoxpeaks
DHP	100 bis - 600	keine Redoxpeaks
Diaminoethan	200 bis -600	fast keine Signale

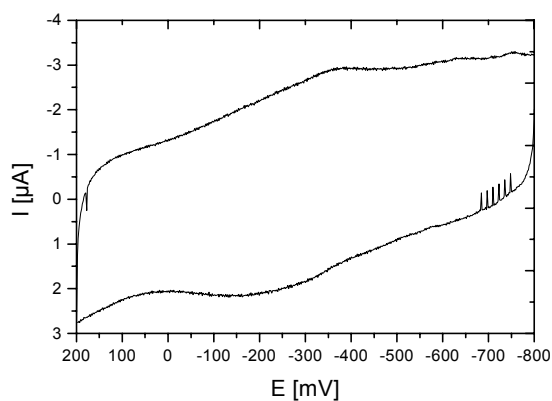
Tabelle 18: Zusammenfassung der Ergebnisse der Cyclovoltammetrie für verschieden modifizierte CYP3A4-GC-Elektroden.



**Abbildung 20: Cyclovoltammogramm einer GC-BSA-GA-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s.**



**Abbildung 21: Cyclovoltammogramm einer GC-DDAB-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s.**



**Abbildung 22: Cyclovoltammogramm einer GC-DMPC-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s.**

## 4) ITO-Elektrode:

Modifizierung mit	Potentialfenster [mV]	Redoxsignale [mV] gegen Ag/AgCl
DDAB	100 bis -600	Redoxpeaks bei -320 mV/-210 mV
DMPC	300 bis -550	Redoxpeaks bei -280 mV/-210 mV
Polylysin	350 bis -700	schwache Signale bei -280 mV/-120 mV
PATS	200 bis -700	keine erkennbaren Signale
BSA-GA	100 bis -600	keine erkennbaren Signale

Tabelle 19: Zusammenfassung der Ergebnisse der Cyclovoltammetrie für verschieden modifizierte CYP3A4-ITO-Elektroden.

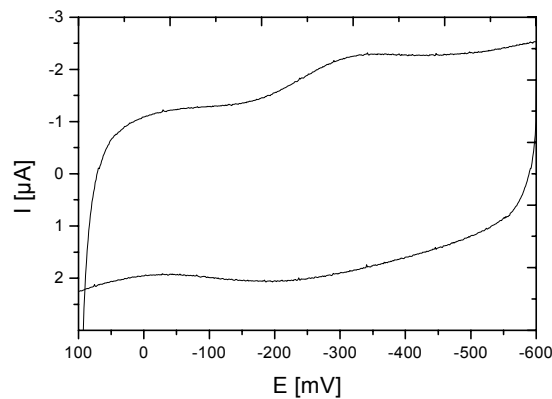


Abbildung 23: Cyclovoltammogramm einer ITO-DDAB-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s.

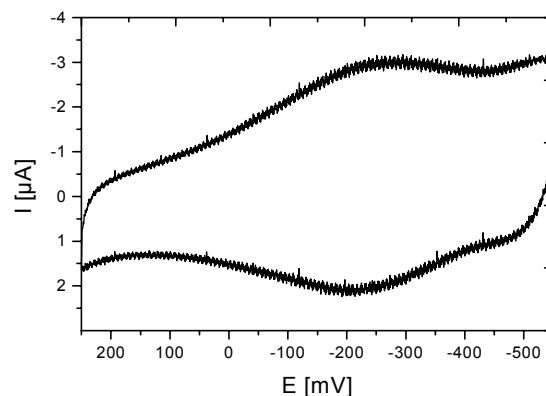
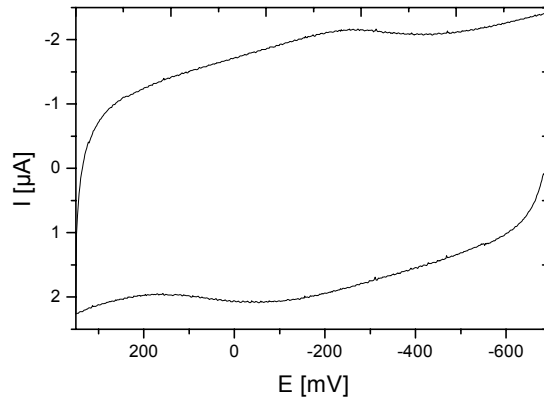


Abbildung 24: Cyclovoltammogramm einer ITO-DMPC-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s.



**Abbildung 25:** Cyclovoltammogramm einer ITO-PLL-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s.

**Pt-Elektrode:**

<b>Modifizierung mit</b>	<b>Potentialfenster [mV]</b>	<b>Redoxsignale [mV] gegen Ag/AgCl</b>
BSA-GA	100 bis -600	keine Redoxpeaks
Oxidation- BSA-GA	100 bis -600	keine Redoxpeaks
Polythiophenessigsäure	200 bis -700	keine Redoxpeaks
Polypyrrol	200 bis -700	keine Redoxpeaks
PATS	200 bis -700	keine Redoxpeaks
Chloranil	200 bis -700	keine Redoxpeaks
Succinanhydrid	200 bis -700	keine Redoxpeaks

**Tabelle 20:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Cyclovoltammetrie für verschieden modifizierte CYP3A4-Pt-Elektroden.



## 5) Au-Elektrode:

Modifizierung mit	Potentialfenster [mV]	Redoxsignale [mV] gegen Ag/AgCl
Cystamin	150 bis - 550	kleiner Reduktionspeak bei -280 mV
Mercaptoanilin	0 bis - 800	kleiner Reduktionspeak bei -410mV
Dithiodipyridin	0 bis - 600	keine Peaks
N-Acetylcystein	0 bis - 600	keine Peaks
PATS	200 bis -700	sehr schwache Redoxpeaks bei -400 mV/-210 mV
MPS-PDDA	200 bis -600	Redoxpeaks bei -153 mV/-68 mV

Tabelle 21: Zusammenfassung der Ergebnisse der Cyclovoltammetrie für verschieden modifizierte CYP3A4-Au-Elektroden.

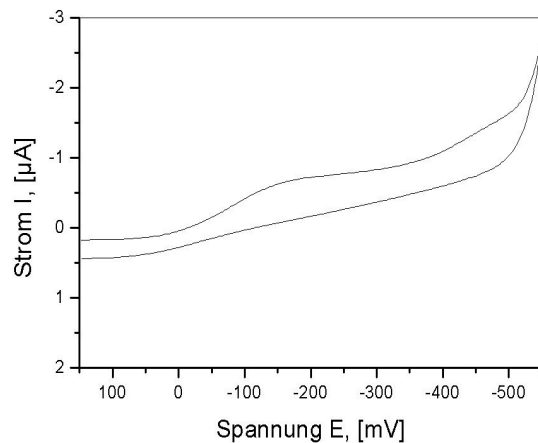


Abbildung 26: Cyclovoltammogramm einer Au-Cystamin-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s.

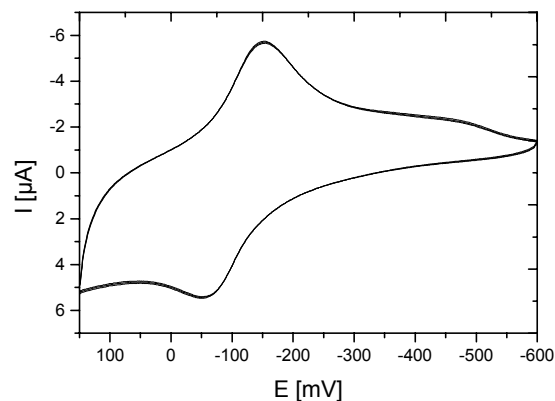
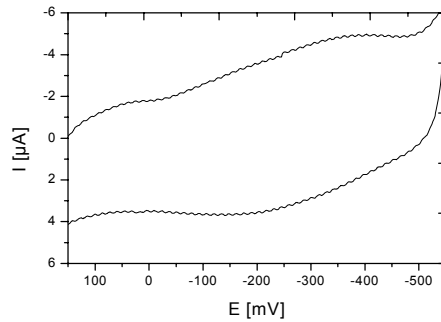


Abbildung 27: Cyclovoltammogramm einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s.



**Abbildung 28: Cyclovoltammogramm einer Au-PATS-CYP3A4-Elektrode in 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s.**

#### 4.2.3.2 Katalytische Aktivität des CYP3A4

Die Ergebnisse der Untersuchungen der katalytischen Eigenschaften der Elektrode mittels Cyclovoltammetrie und Amperometrie, bei denen das Enzym Elektroaktivität aufwies, sind in Tabelle 22 zusammengefaßt. Zur Charakterisierung des katalytischen Vermögens der Enzymelektroden wurde der jeweilige Quotient aus dem Reduktionstrom ( $I_{\text{red,s}}$ ), der in Anwesenheit von 1mM Verapamil zu beobachten war, und dem Reduktionsstrom ( $I_{\text{red}}$ ), der in Abwesenheit von Substrat und Sauerstoff zu beobachten war, berechnet. Außer für die Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode wurden keine eindeutigen Änderungen in den Redoxströmen beobachtet. Die mit der Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode aufgezeichneten Cyclovoltammogramme bzw. Amperogramme zeigen in Anwesenheit von Sauerstoff einen Anstieg des Reduktionsstroms und gleichzeitig eine Abnahme des Oxidationsstroms (siehe Abb. 37 und Abb.39). In Gegenwart von Verapamil und Sauerstoff wurde eine weitere Zunahme des Reduktionssignals beobachtet (siehe Abb. 38 und Abb. 40). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen mit der Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode werden im Abschnitt 4.3.3 und 4.3.6 ausführlich erläutert.

<b>Elektrode*</b>	<b>Methode</b>	$I_{red,s}/I_{red}^{**}$	<b>Hinweis auf katalytische Aktivität</b>	<b>Anmerkungen</b>
PG-BSA-GA-CYP3A4	CV	~1	keine	-
GC-BSA-GA-CYP3A4	Amperometrie	~1	keine	
PG-DAE-CYP3A4	CV	~1	keine	-
	Amperometrie	~1	keine	
PG-DDAB-CYP3A4	CV	nicht eindeutig	nicht eindeutig	Enzymfilm war sehr instabil
GC-DDAB-CYP3A4	Amperometrie	nicht eindeutig	nicht eindeutig	
ITO-DDAB-CYP3A4				
PG-DDAB-CYP3A4	CV	nicht eindeutig	nicht eindeutig	Enzymfilm war sehr instabil
GC-DDAB-CYP3A4	Amperometrie	nicht eindeutig	nicht eindeutig	
ITO-DDAB-CYP3A4				
PG-Polylysin-CYP3A4	CV	~1	keine	-
ITO-Polylysin-CYP3A4	Amperometrie	~1	keine	
Au-Cystamin	CV	~1	keine	-
	Amperometrie	~1	keine	
Au-Mercaptoanilin	CV	~1	keine	-
	Amperometrie	~1	keine	
Au-PATS	CV	~1	keine	-
	Amperometrie	~1	keine	
Au-MPS-PDDA	CV	~3	vorhanden	siehe Abschnitt 4.3
	Amperometrie	1,3	vorhanden	

\* Bezeichnung nach der Modifizierung \*\* Bei einer Verapamilkonzentration von 1 mM

**Tabelle 22: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen der katalytischen Eigenschaften für elektroaktive Enzymelektroden.**

## 4.3 Charakterisierung von CYP3A4-Polyion-Filmen

### 4.3.1 Filmwachstum

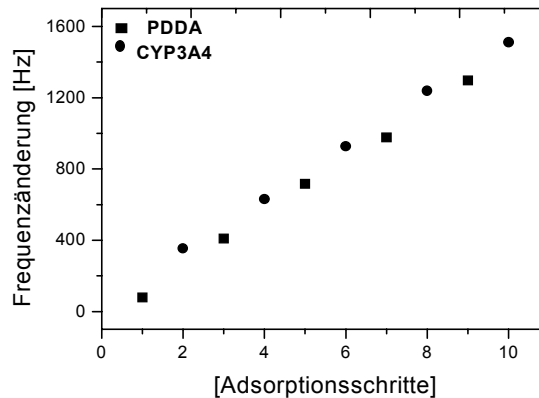


Abbildung 29: Frequenzänderung der Quarzresonator-Goldelektrode in Abhängigkeit von der Zahl der Adsorptionsschritte.

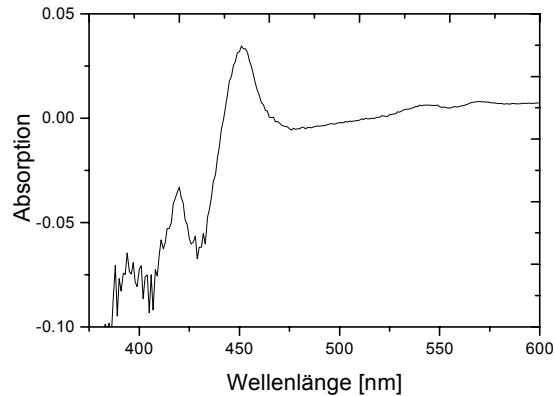
Die Beobachtung des Wachstums der Enzymfilme erfolgte durch Quarzkristall-Mikrowaage-Technik. Mittels QCM-Technik wurde die Eigenfrequenz einer auf einem Quarz-Kristall aufgebrachtene Elektrode gemessen. Die Änderung der Masse der Elektrode wurde nach jedem Adsorptionsschritt durch Registrierung der Frequenzänderung bestimmt. Bei jeder PDDA-Schicht nahm die Frequenz des Resonators um 50 Hz ab. Die Abnahme der Frequenz bei jeder CYP3A4-Adsorption betrug ca. 250 Hz (siehe Abb. 29). Mit Hilfe der Sauerbrey-Gleichung wurde eine Massenänderung von 225 ng für CYP3A4 (auf  $0,16 \text{ cm}^2$ ) und von 45 ng für PDDA (auf  $0,16 \text{ cm}^2$ ) berechnet. Aus der berechneten Masse konnte unter Kenntnis der Enzymdichte eine Schichtdicke von  $(40 \pm 4) \text{ \AA}$  für CYP3A4 berechnet werden [Creighton 1990]. Die errechnete Filmdicke des PDDA Films betrug  $(8 \pm 0,8) \text{ \AA}$ .

### 4.3.2 Spektroskopische bzw. spektroelektrochemische Untersuchungen

#### 4.3.2.1 Spektroskopische Eigenschaften

Das Differenzspektrum (die Subtraktion des Spektrums des reduzierten Enzyms von dem des CO gebundenen reduzierten) des im Phosphatpuffer suspendierten Enzyms zeigte eine starke Bande bei 450 nm (siehe Abb. 30). Im Gegensatz dazu zeigten die

in der OTTLE-Zelle aufgenommene Spektren der oxidierten, reduzierten und CO gebundenen reduzierten Enzyme im Film keine charakteristischen Banden (Methode siehe Abschnitt 3.2.3.2.1).



**Abbildung 30:** Das Differenzspektrum eines im Phosphatpuffer suspendierten CYP3A4-Enzyms.

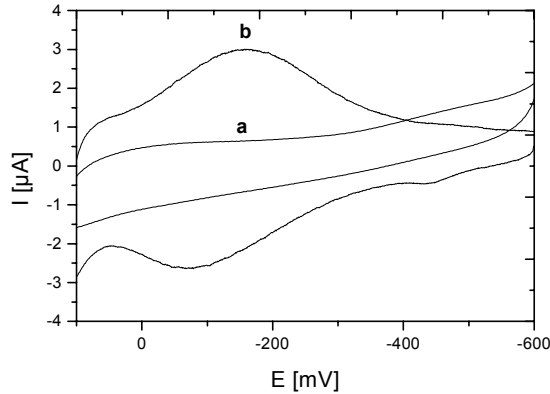
#### 4.3.2.2 Spektroelektrochemische Eigenschaften

Die bei verschiedenen Potentialen in einer optisch durchlässigen Zelle mit CYP3A4-beschichteter Au-Elektrode aufgenommenen Spektren zeigten keine charakteristischen Banden. Daher waren sie nicht verwertbar.

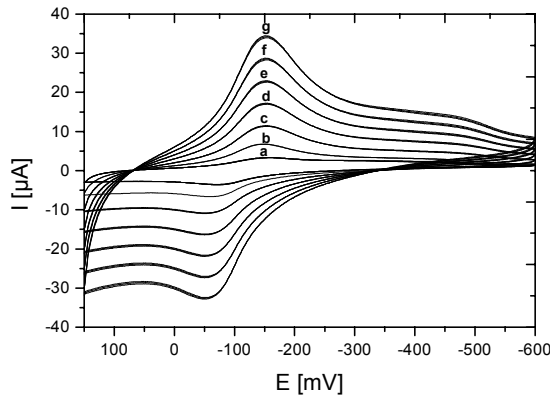
### 4.3.3 Redoxaktivität

#### 4.3.3.1 Cyclovoltammetrie

Cyclovoltammogramme, die direkt nach Eintauchen der Au-MPS-PDDA-Elektrode in die Meßzelle aufgezeichnet wurden, zeigten keine eindeutigen Redoxpeaks. Nach einer Gleichgewichts-Einstellungszeit von 50-60 Minuten wurden jedoch gut definierte Redoxpeaks beobachtet (siehe Abb. 31 und Abb. 32).



**Abbildung 31:** Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-Elektrode (a) ohne CYP3A4-Beschichtung (b) mit CYP3A4-Beschichtung in Phosphatpuffer mit 100 mM KCl (pH=7,4).



**Abbildung 32:** Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode bei verschiedenen Scangeschwindigkeiten (a): 50 mV/s, (b):100 mV/s, (c):200 mV/s,(d):300mV/s, (e):400 mV/s, (f):500 mV/s und (g):600 mV/s in Phosphatpuffer mit 100 mM KCl (pH=7,4).

Das Redoxpotential ( $E^\circ$ ) des jeweiligen Redoxpaares wurde als Mittelpunktspotential aus dem Mittelpunkt zwischen kathodischem und anodischem Peak berechnet. Das Mittelpunktspotential ( $E_m$ ) lag bei  $-110 \pm 5$  mV gegen Ag/AgCl bzw.  $+98 \pm 5$  mV gegen NHE. Die Peakseparation betrug ca. 98 mV. Die Peakhöhe von Oxidations- bzw. Reduktionspeak war im Rahmen der Meßgenauigkeit gleich. Die beiden Ströme verliefen proportional zur Quadratwurzel der Scangeschwindigkeiten. Die Stromstärke zeigte eine lineare Abhängigkeit von der Scangeschwindigkeit im Bereich von 100 mV/s bis 2000 mV/s. Unter 100 mV/s wichen die Kurven von der Reversibilität ab.

Tabelle 23 faßt die Redoxpotentiale bei verschiedenen Scangeschwindigkeiten zusammen.

Scangeschwindigkeit (mV/s)	Reduktionspotential [mV gegen Ag/AgCl]	Oxidationspotential (mV gegen Ag/AgCl)
50	-70	-153
100	-68	-153
200	-65	-152
300	-64	-153
400	-62	-154
500	-61	-153
600	-59	-152

Tabelle 23: Redoxpotentiale für CYP3A4 bei verschiedene Scangeschwindigkeiten.

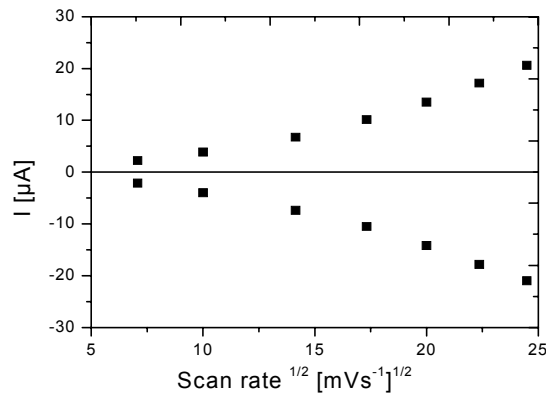


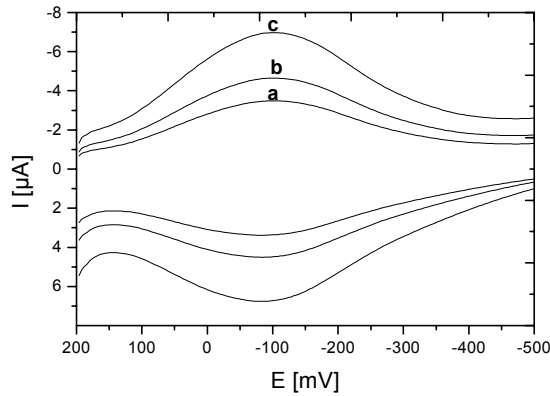
Abbildung 33: Die mit der Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode gemessenen Redoxströme in Abhängigkeit von der Wurzel der Scangeschwindigkeiten.

Die Cyclovoltammogramme mit einer 5-fach beschichteten CYP3A4-Elektrode lieferten gleiche Redoxströme. Die Integration des Reduktionspeaks ergab eine geflossene Ladungsmenge von ca.  $1,9 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ . Mit Hilfe der Faradayschen Gleichung (Gleichung 6) wurde die Konzentration des elektroaktiven Enzyms auf der CYP3A4-Elektrode berechnet. Diese betrug etwa  $19 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ , dies entspricht etwa 70% des auf der Elektrode immobilisierten Enzyms.

#### 4.3.3.2 SQW Voltammetrie

Mittels SQW-Voltammetrie wurden für CYP3A4 ein Reduktionspotential von ca.  $-143 \pm 5 \text{ mV}$  und ein Oxidationspotential von  $-91 \pm 5 \text{ mV}$  als Mittelwert erhalten. Das Mittelpunktspotential ( $E_m$ ) für CYP3A4 betrug damit  $-117 \pm 5 \text{ mV}$  gegen Ag/AgCl bzw.

91 mV gegen NHE (siehe Tabelle 24). Abbildung 34 zeigt die dazugehörigen SQW-Voltammogramme.



**Abbildung 34:** SQW-Voltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode bei verschiedenen Frequenzen (100 Hz, 200 Hz und 600 Hz) in Phosphatpuffer mit 100 mM KCl (pH=7,4).

Frequenz (Hz)	Reduktionspotential (mV gegen Ag/AgCl)	Oxidationspotential (mV gegen Ag/AgCl)
100	-152	-91
200	-149	-90
600	-131	-92

**Tabelle 24:** Reduktionspotentiale in Abhängigkeit ausgewählter Frequenzen.

#### **4.3.4 Einfluß von CO auf die Redoxeigenschaften der CYP3A4-Elektrode**

In Gegenwart von CO sind die Redoxpotentiale für CYP3A4 um etwa 25 mV in positive Richtung verschoben (Abbildung 35).



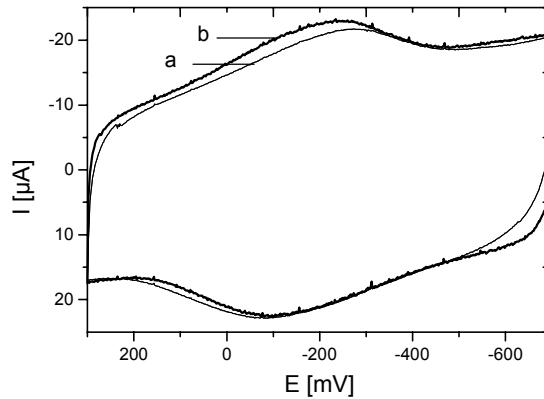


Abbildung 35: Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode (a) in sauerstofffreiem bzw. (b) in CO-gesättigtem Phosphatpuffer mit 100 mM KCl (pH=7,4) bei 500 mV/s.

#### 4.3.5 Einfluß des pH-Wertes auf die Redox Eigenschaften der CYP3A4-Elektrode

Es wurde im pH-Bereich von 5,5 bis 7,5 kein deutlicher Einfluß auf die Redox Eigenschaften des Enzyms festgestellt. Erst über pH 7,5 verschiebt sich das Redoxpotential in negative, und unter pH 5 in positive Richtung (siehe Abb. 36).

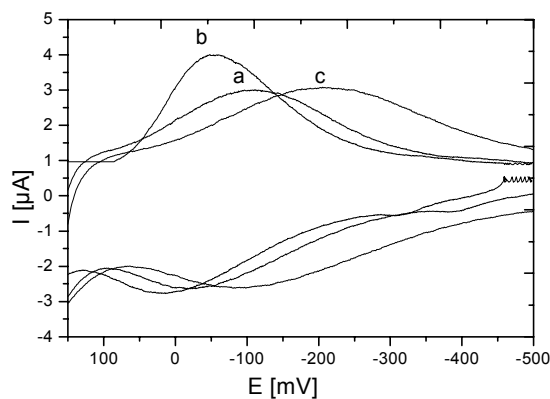


Abbildung 36: Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl bei (a) pH=4,5 (b) pH=7,4 und (c) pH=8,5.

### 4.3.6 Katalytische Aktivität

In Anwesenheit von Sauerstoff war im Cyclovoltammogramm ein deutlicher Anstieg des Reduktionssignals von  $2,8 \mu\text{A}$  auf  $13 \mu\text{A}$  (bei  $100 \text{ mV/s}$ ) bzw. eine Abnahme des Oxidationssignals zu sehen (Abb. 37). Auch bei der Amperometrie konnte beim Einleiten von Sauerstoff in die Lösung eine Zunahme des Reduktionsstroms beobachtet werden (Abb. 39). Die Zugabe von Verapamil zu der Meßlösung führte zu einer weiteren substratkonzentrationsabhängigen Zunahme des Reduktionsstroms (siehe Abb. 38, 40)

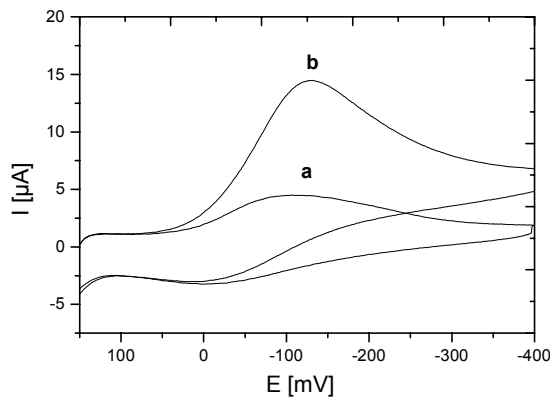


Abbildung 37: Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode (a) in sauerstofffreiem bzw. (b) in sauerstoffhaltigem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s.

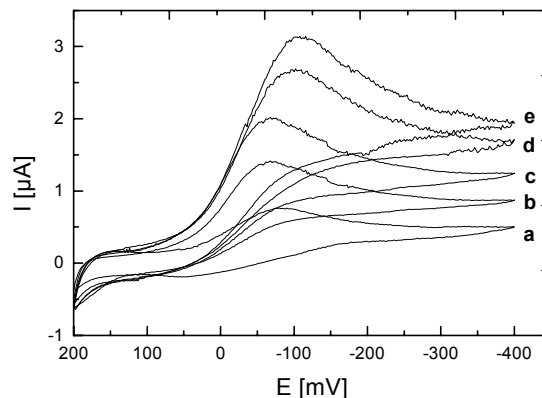
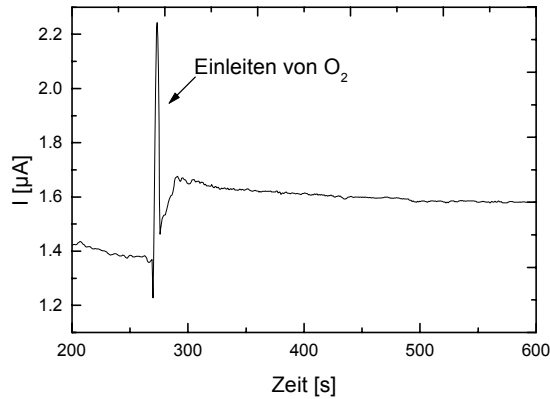
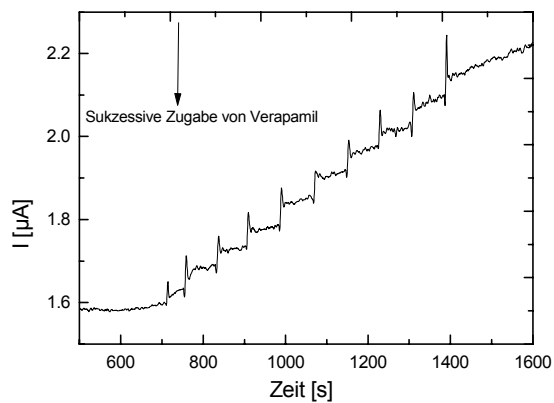


Abbildung 38: Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode (a) in sauerstofffreiem Puffer und in sauerstoffhaltigem Puffer: (b) ohne Verapamil, (c) mit 0,87 mM Verapamil, (d) mit 2,48 mM Verapamil, und (e) mit 3,21 mM Verapamil. Scanrate: 10 mV/s.



**Abbildung 39: Strom-Zeit-Kurve einer bei  $-450$  mV polarisierten Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode beim Einspritzen von 10 ml Sauerstoff in die Meßzelle.**



**Abbildung 40: Strom-Zeit-Kurve einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode bei  $-450$  mV unter sukzessiver portionsweiser Zugabe von Verapamil ( $400 \mu\text{l}$   $20$  mM). Die Endkonzentration in der Lösung erhöhte sich bei jeder Zugabe um  $400 \mu\text{M}$ .**

### **4.3.7 Effekte der Inhibitoren auf die katalytische Aktivität der CYP3A4-Elektrode**

#### **4.3.7.1 Cyclovoltammetrie**

In Anwesenheit von Ketokonazol konnten keine Änderungen in der katalytischen Aktivität der CYP3A4-Elektrode festgestellt werden. Die in Gegenwart von Verapamil bzw. Verapamil und Ketokonazol aufgezeichneten Cyclovoltammogramme zeigten gleiche Stromstärken. Dagegen nahm der in Gegenwart von Verapamil beobachtete Reduktionsstrom beim Einleiten von CO drastisch ab.

#### 4.3.7.2 Amperometrie

Auch bei den amperometrischen Messungen wurde bei dem in Gegenwart von Verapamil gemessenen Reduktionsstrom keine Änderung bei Zugabe von Ketoconazol beobachtet.

#### 4.3.8. Überprüfung der katalytischen Aktivität durch Elektrolyse

Die Produktanalyse nach dreistündiger Elektrolyse mit einer CYP3A4-Elektrode in Anwesenheit von Verapamil erfolgte mittels LC-MS. Bei der Elektrolyse wurden auf rein elektrochemischem Weg in geringen Mengen D617 und Norverapamil gebildet. Dagegen erhöhte sich die Metabolitenbildung bei der Elektrolyse auf enzymatischem Weg um das 10-fache. Die bei einem pH-Wert von 5,5 durchgeführte Elektrolyse zeigte, daß die Produktbildung im Vergleich zu der bei pH 7,4 durchgeführten Elektrolyse um mehr als 50 % reduziert war. Tabelle 25 faßt die Ergebnisse zusammen.

System	Dauer [Min.]	Norverapamil [ $\mu\text{M/l}$ ]	D617 [ $\mu\text{M/l}$ ]	D620 [ $\mu\text{M/l}$ ]	D702	D703
Verapamil Lösung vor der Elektrolyse	0	0,19	0,13	0	*	*
Au-MPS-PDDA-Elektrode; O <sub>2</sub> -haltige Lösung, pH = 7,4,	180	0,95	1,22	0	*	*
Au-MPS-PDDA-CYP3A4; O <sub>2</sub> -freie Lösung, pH = 7,4	180	1,16	1,14	0	*	*
Au-MPS-PDDA-CYP3A4; O <sub>2</sub> -haltige Lösung, pH = 7,4	180	10,24	15,2	0,78	*	*
Au-MPS-PDDA-CYP3A4; O <sub>2</sub> -haltige Lösung, pH = 5,5	180	4,11	5,02	0,43	*	*
* nicht gemessen						

**Tabelle 25:** Die Ergebnisse der Produktanalysen der unter verschiedenen Bedingungen durchgeführten Elektrolysen (Einzelmessungen). Die angelegte Spannung betrug  $-500$  mV; Konzentration von Verapamil:  $500 \mu\text{M}$ .

Aus der Produktanalyse von drei unterschiedlichen Elektrolysen (mit drei gleich präparierten verschiedenen CYP3A4-Elektroden) wurde die Umsatzrate für D617 und Norverapamil berechnet. In Tabelle 26 sind die Ergebnisse zusammengestellt.

Elektrolyse	Umsatzrate (Norverapamil) nmol/min/mg CYP3A4	Umsatzrate (D617) nmol/min/mg CYP3A4
1	80	103
2	108	73
3	59	120

Tabelle 26: Umsatzraten der Hauptmetabolite des Verapamils bei verschiedenen Elektrolysen. Die Elektrolysen wurden mit verschiedenen, gleich präparierten CYP3A4-Elektroden durchgeführt.

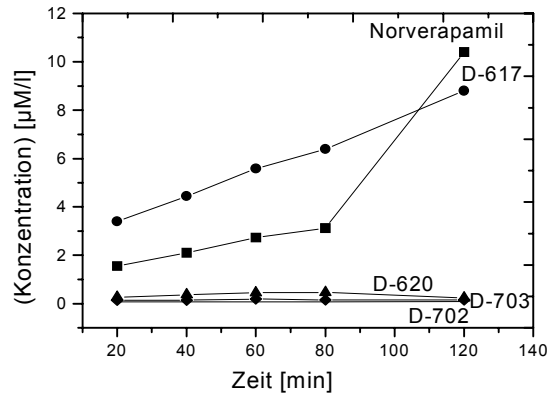
## 4.4 Charakterisierung der ablaufenden Reaktionen

### 4.4.1 Zeitlicher Verlauf der Metabolitenbildung

Die Produktanalyse der nach unterschiedlicher Elektrolysedauer entnommenen Proben zeigte einen linearen Verlauf bei der Bildung der Hauptmetabolite (siehe Abb. 41). Die gemessenen Konzentrationen der Metabolite sind in Tabelle 27 angegeben.

Elektrolyse- dauer [Min.]	Norverapamil [ $\mu\text{M}/\text{l}$ ]	D617 [ $\mu\text{M}/\text{l}$ ]	D620 [ $\mu\text{M}/\text{l}$ ]	D702 [ $\mu\text{M}/\text{l}$ ]	D703 [ $\mu\text{M}/\text{l}$ ]
0	0,19	0,13	0	*	*
20	1,56	3,4	0,27	0,15	0,07
40	2,11	4,44	0,37	0,15	0,07
60	2,74	5,58	0,45	0,2	0,08
80	3,13	6,39	0,46	0,16	0,08
120	10,4	8,8	0,24	0,16	0,09
* nicht gemessen					

Tabelle 27: Ergebnisse des zeitlichen Verlaufs der Metabolitenbildung.



**Abbildung 41:** Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Metabolitenbildung für Verapamil bei der Elektrolyse mit einer CYP3A4-Elektrode. Bedingungen der Elektrolyse: Angelegtes Potential: -500 mV; Konzentration von Verapamil: 500  $\mu\text{M}$ ; pH-Wert der Meßlösung: 7,4.

#### 4.4.2 Einfluß des Inhibitors (Ketoconazol) auf die Metabolitenbildung

Die Produktanalyse zeigte, daß in Gegenwart von Ketoconazol die Bildung von Norverapamil etwa um 60 %, die von D617 um etwa 73% und die von D620 um 61% zurückging (siehe Tabelle 28).

System	Norverapamil [ $\mu\text{M/l}$ ]		D617 [ $\mu\text{M/l}$ ]		D620 [ $\mu\text{M/l}$ ]		D702 [ $\mu\text{M/l}$ ]		D703 [ $\mu\text{M/l}$ ]	
	40	60	40	60	40	60	40	60	40	60
Ohne Ketoconazol in der Lösung	2,41	2,74	3,17	5,58	0,51	0,45	0,13	0,2	0,05	0,08
	2,47		3,20		0,53		0,13		0,05	
Mit 500 $\mu\text{M}$ Ketoconazol in der Lösung	0,51	1,37	0,67	1,86	0,14	0,20	0,15	0,09	*	0,04
	0,45	1,86	0,63	2,64	0,11	0,28	0,09	0,09	*	0,04

**Tabelle 28:** Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Einflusses von Ketoconazol auf die CYP3A4-vermittelte Metabolitenbildung von Verapamil. Für beide Elektrolysen (40 Minuten und 60 Minuten) wurden verschiedene, gleich präparierte CYP3A4-Elektroden verwendet.

#### 4.4.3 Einfluß des Superoxids auf die Metabolitenbildung

Bei der in Gegenwart von SOD durchgeführten Elektrolyse wurde bei einem von zwei Versuchen eine vermehrte Bildung von Norverapamil, von D617 und von D702 beobachtet. Die Ergebnisse der Produktanalyse sind in Tabelle 29 zusammengestellt.

System	Norverapamil [ $\mu\text{M/l}$ ]		D617 [ $\mu\text{M/l}$ ]		D620 [ $\mu\text{M/l}$ ]		D702 [ $\mu\text{M/l}$ ]		D703 [ $\mu\text{M/l}$ ]	
	40	60	40	60	40	60	40	60	20	60
ohne SOD in der Lösung	2,41	2,74	3,17	5,58	0,51	0,45	0,13	0,2	0,05	0,08
	2,47		3,20		0,53		0,13		0,05	
Mit SOD in der Lösung	2,54	3,34	3,51	6,26	0,43	0,88	0,14	0,20	0,05	0,10
	2,42	3,46	3,52	6,44	0,55	0,86	0,14	0,22	0,05	0,11

**Tabelle 29:** Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Einflusses von Superoxid auf die CYP3A4-vermittelte Metabolitenbildung von Verapamil. Für beide Elektrolysen (40 Minuten und 60 Minuten) wurden verschiedene, gleich präparierte CYP3A4-Elektroden verwendet.

#### 4.4.4 Einfluß des des Wasserstoffperoxids auf die Metabolitenbildung

In Anwesenheit von Katalase reduzierte sich die Bildung von Norverapamil um 50 %, von D-617 um 55%, von D620 um 61% und von D702 um 37 % (Mittelwerte zweier Versuche). Die Inkubation des Verapamils mit einer CYP3A4-Elektrode (ohne das Anlegen einer Spannung) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  ergab die gleichen Hauptmetabolite, die Produktbildung verringerte sich jedoch um ca 55-60 %. Die Inkubation nur mit Verapamil und  $\text{H}_2\text{O}_2$  führte zur Bildung von Norverapamil. Die Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt Tabelle 30.

System	Norverapamil [ $\mu\text{M}/\text{l}$ ]		D617 [ $\mu\text{M}/\text{l}$ ]		D620 [ $\mu\text{M}/\text{l}$ ]		D702 [ $\mu\text{M}/\text{l}$ ]		D703 [ $\mu\text{M}/\text{l}$ ]	
	40	60	40	60	40	60	40	60	40	60
Ohne Katalase in der Lösung	2,41	2,74	3,17	5,58	0,51	0,45	0,13	0,2	0,05	0,08
	2,47		3,20		0,53		0,13		0,05	
Mit Katalase in der Lösung	1,59	0,82	1,61	2,18	0,20	0,18	0,09	0,12	*	0,05
	1,61	1,12	1,61	2,36	0,17	0,20	0,09	0,12	*	0,05
Inkubation mit Enzymelektrode + 500 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	1,01	-	1,32	-	0,17	-	0,04	-	*	-
Inkubation mit 500 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ ohne Enzym	1,1	-	0,12	-	0,13	-	0,2	-	0,07	-
* < Nachweisgrenze, - nicht gemessen										

**Tabelle 30: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Einflusses von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die CYP3A4-vermittelte Metabolitenbildung von Verapamil. Für beide Elektrolysen (40 Minuten und 60 Minuten) wurden verschiedene, gleich präparierte CYP3A4-Elektroden verwendet.**

#### **4.4.5 $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung und Sauerstoffverbrauch**

Die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw. der Sauerstoffverbrauch nahmen im Gegenwart von Enzym zu. Während der Sauerstoffverbrauch bei gleichzeitiger Anwesenheit von Enzym und Verapamil zunahm, wurde bei der Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  keine deutliche Änderung beobachtet (siehe Tabelle 31).



System	Sauerstoffverbrauch [nmol/min]	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung [nmol/min]
Au-MPS-PDDA-Elektrode in Puffer	0,7	< 1
Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode in Puffer	2,4	~2
Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode in Puffer + 500 µM Verapamil	3,52	~2
Detektionslimit von O <sub>2</sub> : 0.1ppm = 3,6 µM/l; Detektionslimit von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : 16 µM/l		

Tabelle 31: Die Ergebnisse (Mittelwerte zweier Versuche) bzgl. des Sauerstoffverbrauchs bzw. der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung bei unter verschiedenen Bedingungen durchgeführten Elektrolysen (Elektrolysedauer: 1 Stunde).

#### 4.5 Ergänzende Untersuchung der katalytischen Eigenschaften der CYP3A4-Elektrode mit weiteren CYP3A4-Substraten

Die mit der Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode aufgezeichneten Cyclovoltammogramme bzw. Amperogramme zeigten in Anwesenheit von Sauerstoff und Midazolam einen deutlichen Anstieg des Reduktionsstroms. Die Zunahme des Reduktionsstroms zeigte außerdem eine Abhängigkeit von der Substratkonzentration (siehe Abb. 42-43).

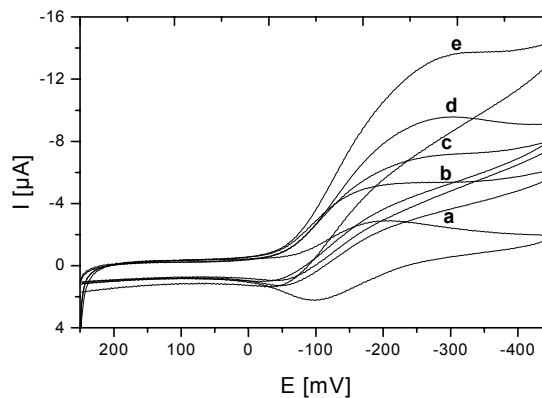
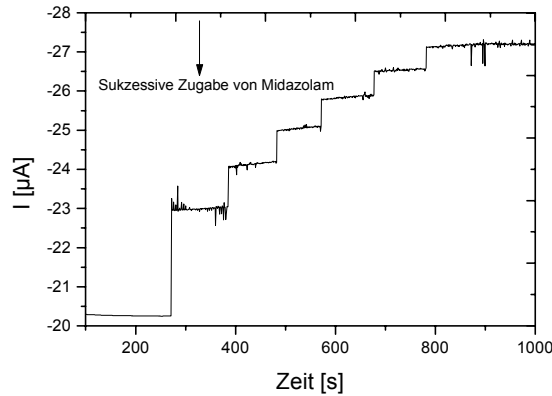


Abbildung 42: Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode (a) in sauerstofffreier und (b) in sauerstoffhaltiger Lösung ohne Midazolam, (c) mit 200 µM Midazolam, (d) mit 800 M Midazolam, und (e) mit 1,5 mM Midazolam. Die Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen in der Meßlösung.

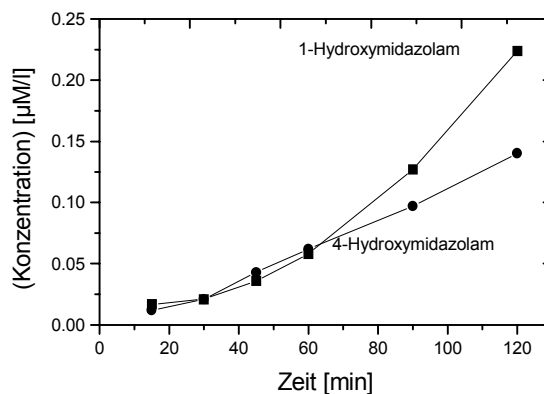


**Abbildung 43: Strom-Zeit-Kurve einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode bei  $-450$  mV unter sukzessiver Zugabe von Midazolam ( $200 \mu\text{M}$ ,  $400 \mu\text{M}$ ,  $600 \mu\text{M}$ ,  $800 \mu\text{M}$ ,  $1 \text{ mM}$  und  $1,5 \text{ mM}$ ). Die Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen in der Meßlösung.**

Bei der mit Midazolam ( $50 \mu\text{M}$ ) zusätzlich durchgeführten Elektrolyse unter verschiedenen Bedingungen zeigte die Produktanalyse folgende Metabolitenbildung (siehe Tabelle 32): Als Hauptmetabolit wurde 1'-Hydroxymidazolam (1'-Hydroxy-MDZ) und 4-Hydroxymidazolam (4-Hydroxy-MDZ) gebildet. Die Bildung beider Metabolite zeigte einen fast linearen Verlauf. Die Umsatzrate für 1'-Hydroxy-MDZ bzw. für 4-Hydroxy-MDZ betrug  $11,4 \text{ nmol/min/mg CYP3A4}$  bzw.  $1,95 \text{ nmol/min/mg CYP3A4}$ . Bei der Elektrolyse mit einer höheren Midazolamkonzentration ( $500 \mu\text{M}$ ) wurde eine viel niedrigere Umsatzrate für beide Metabolite gefunden. In Gegenwart von Katalase ging die Bildung von 1'-Hydroxy-MDZ um 30% zurück. Dagegen wurde in Anwesenheit von SOD eine Erhöhung bei der Bildung von 1'-Hydroxy-MDZ um 27% beobachtet. Ferner zeigte die Produktanalyse der in Gegenwart von Ketoconazol durchgeführten Elektrolyse eine um 82 % bzw. um 74% verminderte Bildung von 1'-Hydroxy-MDZ bzw. 4-Hydroxy-MDZ. Während bei der Inkubation des Midazolams mit der CYP3A4-Elektrode und  $\text{H}_2\text{O}_2$  eine signifikante Menge 1'-Hydroxy-MDZ gebildet wurde, war diese bei der Inkubation nur mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw. bei der Elektrolyse ohne Enzym-beschichtete Elektrode vernachlässigbar.

System	4-Hydroxy MDZ	1'-Hydroxy MDZ
	[nM]	[nM]
50 $\mu$ M MDZ/30 Min. Elektrolyse	44	262
	46	267
50 $\mu$ M MDZ/Katalase/30 Min. Elektrolyse	35	196
	35	194
50 $\mu$ M MDZ/SOD/30 Min. Elektrolyse	39	334
	34	334
50 $\mu$ M MDZ/50 $\mu$ M Ketoconazol/ 30 Min. Elektrolyse	11	52
	13	44
50 $\mu$ M MDZ/ohne Enzym 100 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / 30 Min. Inkubation	<Nachweisgrenze	<Nachweisgrenze
50 $\mu$ M MDZ/Mit CYP3A4-Elektrode/ 100 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /30 Min. Inkubation	12	60
	11	54
50 $\mu$ M MDZ/ 30 Min. Elektrolyse mit Au- PDDA-Elektrode	8	7
	8	6

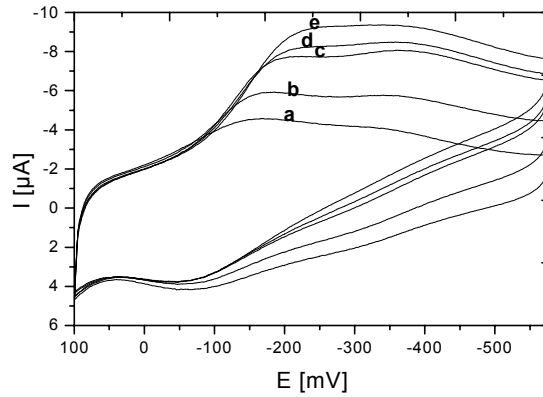
**Tabelle 32:** Die Ergebnisse der Produktanalysen bei unter verschiedenen Bedingungen durchgeführten Elektrolysen.



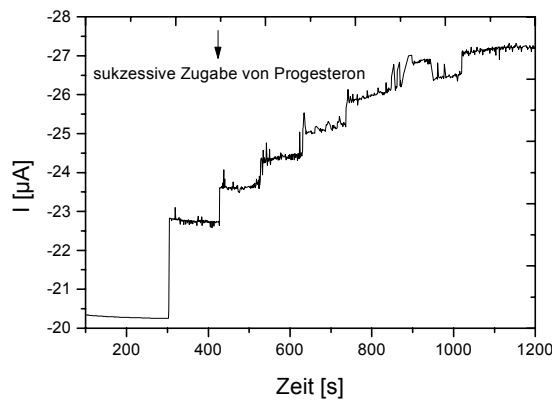
**Abbildung 44:** Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Metabolitenbildung für Midazolam bei der Elektrolyse mit einer CYP3A4-Elektrode.

Die Untersuchung der katalytischen Eigenschaft der CYP3A4-Elektrode mit weiteren Substraten (Chinidin und Progesteron) zeigte im Cyclovoltammogramm einen deutlichen Anstieg des Reduktionssignals. Auch bei der Amperometrie führte die

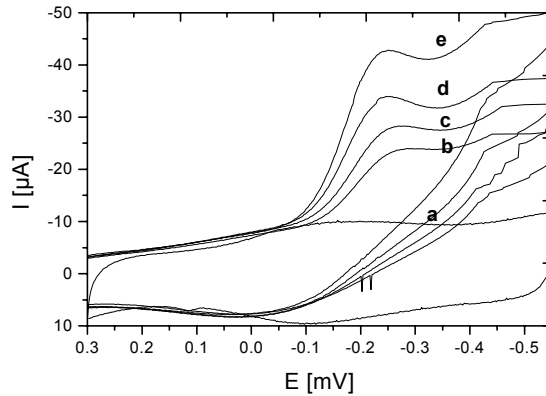
Zugabe von Chinidin bzw. Progesteron zu der Meßlösung zu einer substratkonzentrationsabhängigen Zunahme des Reduktionsstroms (Abbildung 45-48).



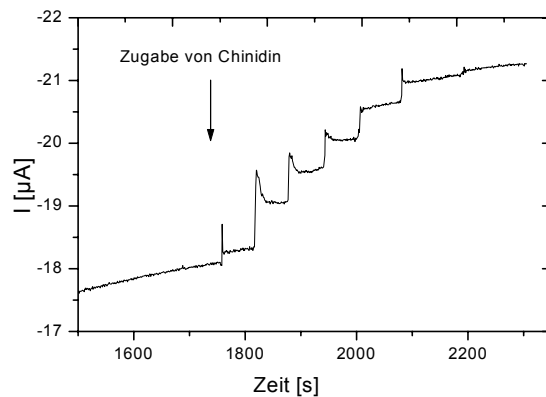
**Abbildung 45:** Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode (a) in sauerstofffreier und (b) in sauerstoffhaltiger Lösung ohne Progesteron, (c) mit 200  $\mu\text{M}$  Progesteron, (d) mit 300  $\mu\text{M}$  Progesteron, und (e) mit 800  $\mu\text{M}$  Progesteron. Die Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen in der Meßlösung.



**Abbildung 46:** Strom-Zeit-Kurve einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode bei  $-450$  mV unter sukzessiver Zugabe von Progesteron (50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  und 800  $\mu\text{M}$ ). Die Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen in der Meßlösung.



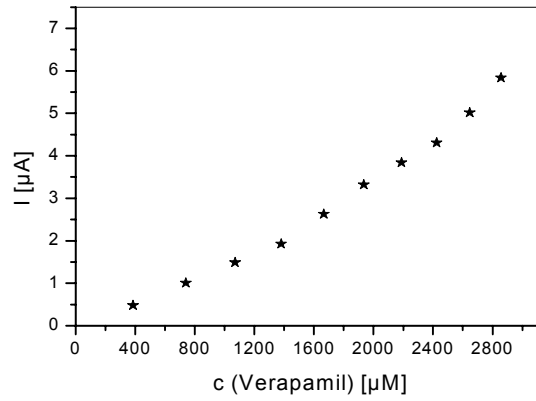
**Abbildung 47:** Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode (a) in sauerstofffreier und (b) in sauerstoffhaltiger Lösung ohne Chinidin, (c) mit 50  $\mu\text{M}$  Chinidin, (d) mit 200  $\mu\text{M}$  Chinidin, und (e) mit 750  $\mu\text{M}$  Chinidin. Die Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen in der Meßlösung.



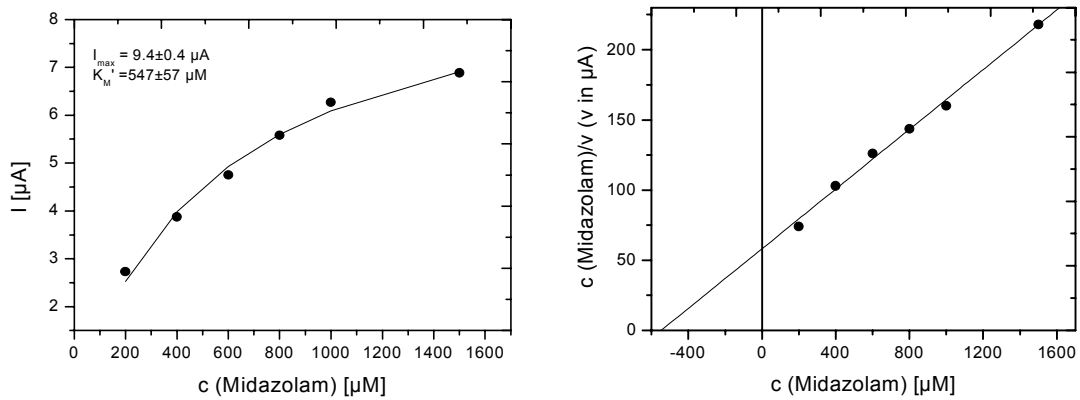
**Abbildung 48:** Strom-Zeit-Kurve einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode bei  $-450$  mV unter sukzessiver Zugabe von Chinidin (100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$  und 1 mM). Die Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen in der Meßlösung.

## 4.6 Kinetische Parameter

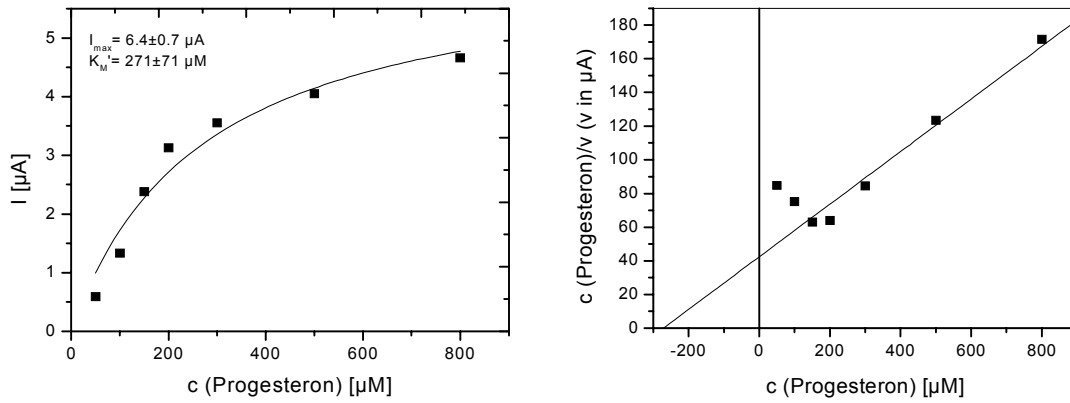
Die kinetischen Berechnungen aus den amperometrischen Daten für die verwendeten CYP3A4-Substrate erfolgte unter Anwendung der Michaelis-Menten-Gleichung (siehe Abschnitt 3.2.6). Die Ergebnisse sind in Tabelle 33 zusammengestellt. Im Falle des Verapamils war eine Schätzung der Parameter wegen mangelnder Sättigung nicht durchführbar (siehe Abb. 49 bis Abb. 52).



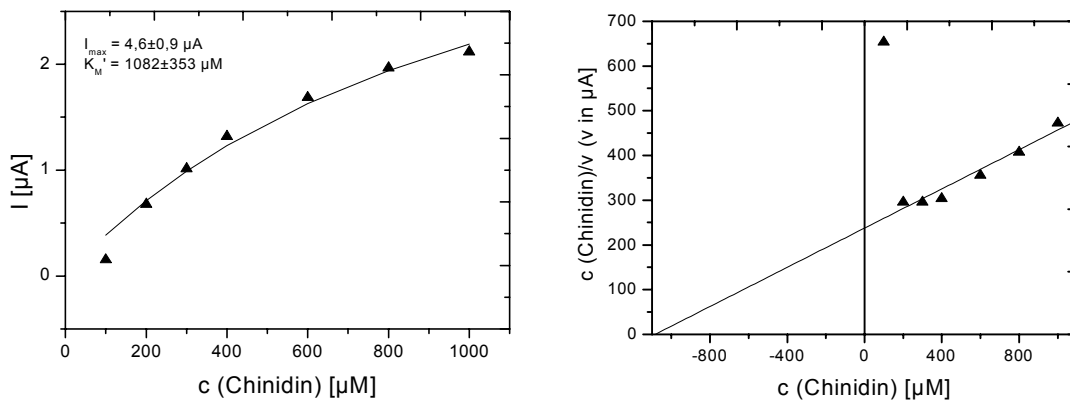
**Abbildung 49: Auftragung der mittels Amperometrie gemessenen Reduktionsströme unter sukzessiver Zugabe von Verapamil gegen die Verapamilkonzentrationen.**



**Abbildung 50: Lineare Auftragung der Umsatzrate in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. (v) entspricht hier den mittels Amperometrie gemessenen Reduktionsströmen unter sukzessiver Zugabe von Midazolam (links). Hanes-Plot: Abhängigkeit des Reduktionsstromes von der Midazolamkonzentration (rechts).**



**Abbildung 51: Lineare Auftragung der Umsatzrate in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. (v) entspricht hier den mittels Amperometrie gemessenen Reduktionsströmen unter sukzessiver Zugabe von Progesteron (links). Hanes-Plot: Abhängigkeit des Reduktionsstromes von der Progesteronkonzentration (rechts).**



**Abbildung 52: Lineare Auftragung der Umsatzrate in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. (v) entspricht hier den mittels Amperometrie gemessenen Reduktionsströmen unter sukzessiver Zugabe von Chinidin (links). Hanes-Plot: Abhängigkeit des Reduktionsstromes von der Chinidinkonzentration (rechts).**

### 4.6.1 Zusammenstellung der kinetischen Daten

Tabelle 33 faßt die ermittelten kinetischen Daten zusammen.

Substrate	$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	$I_{\text{max}}$ [ $\mu\text{A}$ ]
Verapamil	*	*
Midazolam	547±57	9,4±0,4
Progesteron	271±71	6,4±0,7
Chinidin	1082±353	4,6±0,9
* nicht auswertbar		

Tabelle 33: Schätzwerte der kinetischen Parameter der untersuchten Substrate des CYP3A4 mit den zugehörigen Standardfehlern.

## 4.7 Übertragung der Methoden auf CYP2D6

### 4.6.1 Redoxaktivität

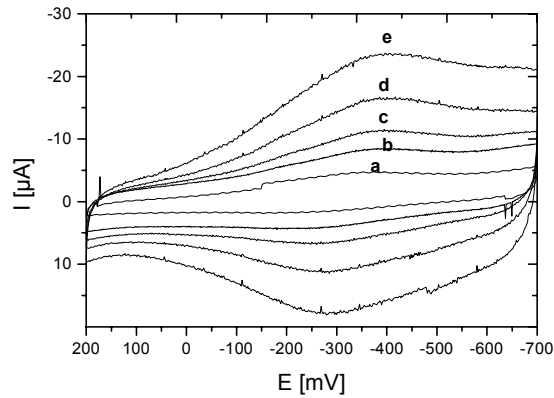
#### 4.6.1.1 Cyclovoltammetrie

Bei der Au-MPS-PDDA-CYP2D6-Elektrode waren sehr schwache Redoxsignale zu erkennen. Dagegen konnten bei der Au-MPS-PDDA-PSS-CYP2D6-Elektrode gut ausgeprägte Redoxpeaks beobachtet werden (Abb. 53). Die Redoxpotentiale für CYP2D6 bei verschiedenen Scangeschwindigkeiten sind in der Tabelle 34 angegeben. Das Mittelpunktspotential ( $E_M$ ) lag bei ca. -321 mV gegen Ag/AgCl (-113 mV gegen NHE). Die Peakseparation lag im Bereich von ca. 89 mV bis 117 mV. Die Peakhöhe des Oxidations- bzw. Reduktionspeaks war fast gleich. Die Stromstärke zeigte eine lineare Abhängigkeit von der Wurzel der Scangeschwindigkeit (siehe Abb. 54).

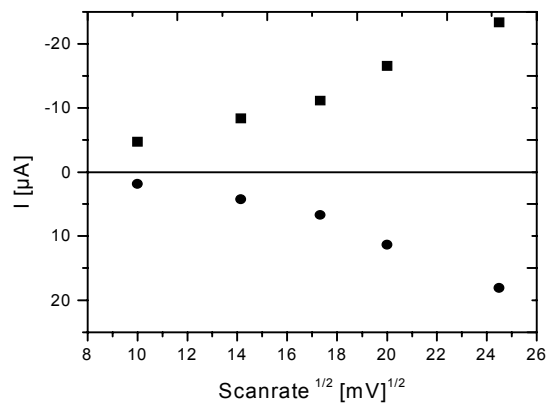
Scangeschwindigkeit [mV/s]	Reduktionspotential [mV gegen Ag/AgCl]	Oxidationspotential [mV gegen Ag/AgCl]
100	-386	-275
200	-391	-274
300	-381	-261
400	-372	-263
500	-356	-267

Tabelle 34: Redoxpotentiale für CYP2D6 bei verschiedenen Scangeschwindigkeiten.





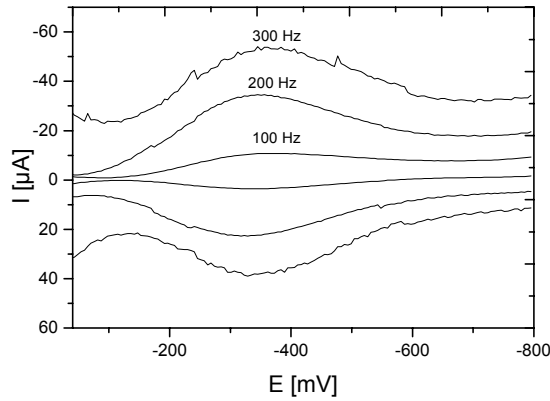
**Abbildung 53:** Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP2D6-Elektrode bei verschiedenen Scangeschwindigkeiten (100 mV/s, 200 mV/s, 300mV/s, 400 mV/s und 500 mV/s ) in Phosphatpuffer/KCl (pH = 7,4).



**Abbildung 54:** Die mit Au-MPS-PDDA-PSS-CYP2D6-Elektrode gemessenen Redox-Ströme in Abhängigkeit von der Wurzel der Scangeschwindigkeiten.

#### 4.6.1.2 SQW-Voltammetrie

Mittels SQW-Voltammetrie wurde für CYP2D6 ein Mittelpunktspotential ( $E_M$ ) von ca. -353 mV als Mittelwert erhalten (siehe Tabelle 35). Abbildung 55 zeigt die dazugehörigen SQW-Voltammogramme.



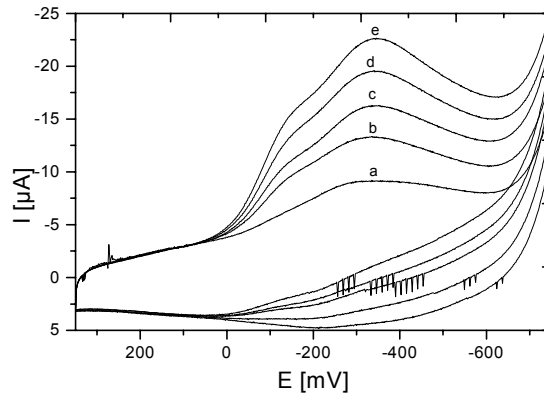
**Abbildung 55:** SQW-Voltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP2D6-Elektrode bei verschiedenen Frequenzen (100 Hz, 200 Hz und 300 Hz) in Phosphatpuffer/KCl (pH=7,4).

Frequenz [Hz]	Reduktionspotential [mV gegen Ag/AgCl]	Oxidationspotential [mV gegen Ag/AgCl]
100	-367	-349
200	-351	-336
300	-367	-346

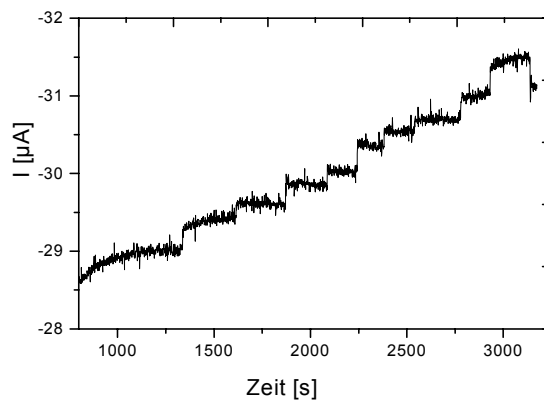
**Tabelle 35:** Redoxpotentiale einer Au-MPS-PDDA-PSS-CYP2D6-Elektrode bei verschiedenen Frequenzen (100 Hz, 200 Hz und 300 Hz) in Phosphatpuffer mit 100 mM KCl (pH=7,4).

#### 4.6.2 Katalytische Aktivität

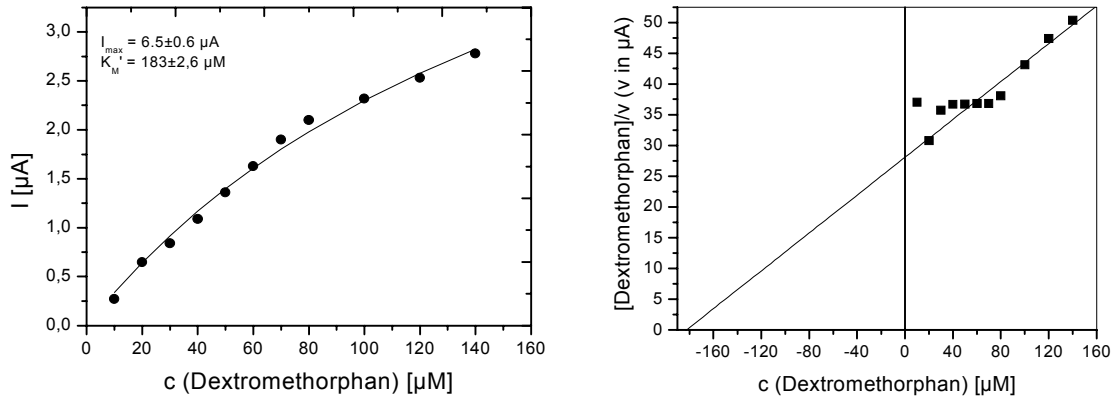
Die mit der Au-MPS-PDDA-PSS-CYP2D6-Elektrode aufgezeichneten Cyclovoltammogramme bzw. Amperogramme zeigten in Anwesenheit von Sauerstoff und Dextromethorphan eine substratkonzentrationsabhängige Zunahme des Reduktionsstroms (siehe Abb. 56 und Abb. 57). Die kinetische Berechnung aus den amperometrisch erhaltenen Daten ergab einen  $K_M'$ -Wert von  $183 \pm 2,6 \mu\text{M}$  und einen  $I_{\text{max}}$ -Wert von  $6,5 \pm 0,6 \mu\text{A}$  (siehe Abb. 58).



**Abbildung 56:** Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP2D6-Elektrode (a) in sauerstofffreier und (b) in sauerstoffhaltiger Lösung ohne Dextromethorphan, (c) mit 10  $\mu\text{M}$  Dextromethorphan, (d) mit 40  $\mu\text{M}$  Dextromethorphan und (e) mit 100  $\mu\text{M}$  Dextromethorphan. Die Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen in der Meßlösung.



**Abbildung 57:** Strom-Zeit-Kurve einer Au-MPS-PDDA-PSS-CYP2D6-Elektrode bei  $-450$  mV unter sukzessiver Zugabe von Dextromethorphan (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 70  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 120  $\mu\text{M}$  und 140  $\mu\text{M}$ ). Die Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen in der Meßlösung.



**Abbildung 58: Lineare Auftragung der Umsatzrate in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. (v) entspricht hier den mittels Amperometrie gemessenen Reduktionsströmen unter sukzessiver Zugabe von Dextromethorphan (links). Hanes-Plot: Abhängigkeit des Reduktionsstromes von der Dextromethorphankonzentration (rechts).**

## **5 Diskussion**

Zielstellung der Arbeit war es, amperometrische Sensoren zu entwickeln, die mit humanen Cytochrom P-450-Enzymen beschichtet sind, um mit diesen die Substrate bzw. Inhibitoren der jeweiligen Enzyme zu identifizieren. Dazu sollte in erster Linie das geeignete Immobilisierungsverfahren für die Enzyme entwickelt werden.

### Elektrochemische Untersuchung von CYP3A4 in Lösung

Die Untersuchungen zur Darstellung des Redoxpaares des CYP3A4 in Lösung unter sauerstofffreien Verhältnissen ergaben folgendes Ergebnis: Das CYP3A4 in der Lösung zeigte keine Elektroaktivität auf GC-, Au- bzw. Pt-Elektroden. Es ist bekannt, daß aufgrund des geringen Ladungstransfers zwischen der Elektrode und den Makromolekülen in der Lösung, die direkte Untersuchung der elektrochemischen Eigenschaften kaum realisierbar ist [Hall 1990]. Dies wiederum könnte aus einem ungünstig großen Abstand zwischen dem Redoxzentrum des Enzyms und der Elektrodenfläche resultieren.

### Elektrochemische Untersuchung an CYP3A4-beschichteten Elektroden

#### *Elektroaktivität von Analyten und Reagenzien*

Da die verwendeten Immobilisierung- bzw. Modifizierungsreagenzien und die Substrate der Enzyme im untersuchten Potentialbereich zwischen +200 mV und -800 mV keine Redox Eigenschaften zeigten, konnte ein direkter Elektronentransfer zwischen Elektrode und Substrat bzw. die Elektroaktivität der Reagenzien ausgeschlossen werden.

#### *Indirekter Elektronentransfer zu CYP3A4*

Von den untersuchten Mediatoren bzw. leitfähigen Polymeren zeigten außer Polythiophen-3-Essigsäure und Neutralrot alle ein reversibles Redoxverhalten. Für die uneingeschränkte Anwendbarkeit sollten die elektrochemischen Reaktionen der Mediatoren an der Elektrode reversibel und ohne Nettoverlust der elektroaktiven Substanz ablaufen. Somit bieten sich die oben genannten Substanzen prinzipiell als Mediatoren an [Cardosi et al. 1987]. Die beobachtete Abnahme der Redoxaktivität des Mediators auf der enzymbeschichteten Elektrode läßt sich dadurch begründen, daß die Zugänglichkeit des Mediators auf der beschichteten Elektrode im Vergleich

zu der unbeschichteten Elektrode verringert wurde. Die für Kobaltsepulchrat im aeroben Medium beobachtete Zunahme des Reduktionsstromes ist auf die Interaktion des Mediators mit Sauerstoff zurückzuführen. Durch die Reduktion des Sauerstoffs am reduzierten Kobaltsepulchrat wird der Mediator im oxidierten Zustand regeneriert, was zu einer Zunahme des Reduktionssignals führt [Estabrook et al. 1996]. Außer Kobaltsepulchrat zeigte keine der untersuchten Substanzen einen Hinweis auf die Fähigkeit zur Elektronenvermittlung zwischen der Elektrode und dem Enzym. Die cyclovoltammetrischen Untersuchungen mit der GC-BSA-GA-CYP3A4-Elektrode in Anwesenheit von Kobaltsepulchrat zeigten, daß der gemessene Reduktionsstrom eine Abhängigkeit von der Substratkonzentration aufweist. Die beobachtete Stromänderung war sehr unregelmäßig. Die Untersuchungen der Zeitabhängigkeit der Redoxeigenschaften des Kobaltsepulchrats deuteten auf einen Adsorptionseffekt des Kobaltsepulchrats an der enzymbeschichteten Elektrode hin. Dies hat möglicherweise Einfluß auf die Bindung des Substrats am Enzym und könnte daher eine Ursache für die unregelmäßige Stromänderung sein. Eine Co-Immobilisierung des Mediators könnte hier vielleicht Abhilfe schaffen, leider spricht aber die relativ hohe Löslichkeit des Kobaltsepulchrats gegen diese Überlegung. Auch mit der PG-DDAB-CYP3A4-Elektrode wurde in Anwesenheit von Kobaltsepulchrat eine substratkonzentrationsabhängige Stromänderung beobachtet. Die mechanische Instabilität der Enzymschicht auf der Elektrode bedingte, daß die Untersuchungen in Hinsicht auf die katalytischen Eigenschaften der Enzymelektrode unvollständig bleiben mußten. Der Versuch, die mechanische Stabilität durch Einbau von Glutardialdehyd zu erhöhen, blieb erfolglos.

#### Direkter Elektronentransfer zur CYP3A4-Elektrode

Die verschiedenen Versuche, das Enzym auf der Elektrode zu immobilisieren und damit einen besseren Elektronentransfer zu erzielen, brachten unterschiedliche Ergebnisse. Die Immobilisierung des CYP3A4 durch cross-linking mit Glutardialdehyd und einem inerten Protein wie BSA auf PG- bzw. GC-Elektroden führte zu einem schwach erkennbaren Elektronentransfer zwischen dem Enzym und der Elektrode im Potentialbereich zwischen  $-100$  mV und  $-400$  mV ( $108$  mV und  $-192$  mV gegen NHE). Dies wurde auch bei elektrochemischen Untersuchungen am bakteriellen Enzym P-450<sub>cam</sub> beobachtet (Joseph et al. 1997). Die Redoxpotentiale für P-450-Enzyme wurden mit anderen Verfahren zu einem Mittelpunktspotential zwischen  $-350$  mV und  $-289$  mV (gegen NHE) bestimmt [Guengerich 1983, Sligar et al. 1976]. Bei Anwendung des gleichen Immobilisierungsverfahrens auf die Platinelektrode waren in diesem Bereich keine Redoxsignale zu detektieren. Während auf der Diaminoethan-modifizierten PG-Elektrode ein Reduktionspeak bei

–300 mV zu beobachten war, fehlte auf der Diaminoethan-modifizierten GC-Elektrode ein erkennbarer Elektronentransfer.

Die Immobilisierung mittels Lipidmembranen, wie z.B. Didodecyldimethylammoniumbromid (DDAB), Dihexadecylphosphat (DHP) und Phosphatodylcholin-Derivaten wie z.B. Dimyristoylphosphatodylcholin (DMPC) und Dilaurylphosphatodylcholin (DLPC) als Matrizen erbrachte uneinheitliche Resultate. Das Enzym in DHP- bzw. DLPC-Membranen zeigte keine Elektroaktivität auf der PG- bzw. auf der GC-Elektrode. In Lipidmembranen aus DDAB bzw. DMPC konnten für CYP3A4 auf der ITO-Elektrode zwar ein eindeutiger und auf der PG- bzw. GC-Elektrode ein schwacher Elektronentransfer (Signal im Bereich –200 mV und –450 mV) beobachtet werden, jedoch verschwanden die Signale nach einiger Zeit. Das Enzym wurde vermutlich aus der Matrix herausgewaschen. Auch die Anwendung von Vernetzungsreagenzien brachte keinen positiven Einfluß auf das Auswaschen des Enzyms. Das Immobilisierungsverfahren mittels Polylysin zeigte zwei Redoxsignale bei ca. –260 mV bzw. bei –160 mV auf der PG- und auf der ITO- Elektrode.

Bei Verwendung der elektrochemisch abgeschiedenen leitenden Polymere, wie z. B. Polythiophenessigsäure und Polypyrrol als dreidimensionale Immobilisierungsmatrizen, konnte auf der Pt-Elektrode für P-450-Enzyme kein ausreichender Elektronentransfer erzielt werden.

Auch die Immobilisierungstechniken mittels vorgeschalteter Modifizierung der Elektrodenoberfläche ergaben unterschiedliche Resultate. Eine Realisierung des Elektronentransfers zwischen Enzym und der mittels PATS-modifizierten Pt- bzw. Au-Elektrode gelang nicht. Auf der Laurinsäure-modifizierten PG-Elektrode konnte kein Elektronentransfer festgestellt werden. Die Darstellung des Redoxpaares von CYP3A4 durch kovalente Bindung via Chloranil bzw. via Succinanhydrid auf der Pt-Elektrode erwies sich als erfolglos. Auf der Cystamin- bzw. Mercaptoanilin-modifizierten Au-Elektrode wurde ein Reduktionspeak bei -280 mV bzw. bei ca. -410 mV beobachtet. In beiden Fällen war keine Rückoxidation des Enzyms zu detektieren, was auf einen irreversiblen Elektronentransfer schließen läßt. Hingegen wurde ein Redoxpaar im Potentialbereich zwischen -200 mV und -450 mV für das Enzym auf der PATS-modifizierten Au-Elektrode beobachtet. Bei der Kopplung des Enzyms auf der Au-Elektrode mit Dithiopyridin bzw. N-Acteylcystein zeigte CYP3A4 keine Elektroaktivität. Die oben genannten Immobilisierungsverfahren sind literaturbekannt (siehe Abschnitt 3.1.1.2) und für verschiedene Biomoleküle erfolgreich angewendet worden. Es ist jedoch auch bekannt, daß eine Vorhersage, ob eine bestimmte Immobilisierungsmethode für ein bestimmtes Enzym geeignet ist

oder nicht, oft nicht möglich ist [Gacesa 1987]. Daher müssen bei der Entwicklung von Immobilisierungsverfahren mehrere Wege verfolgt werden.

Der Ansatz, das Enzym durch Selbstorganisation auf modifizierten Elektroden zu immobilisieren, führte letztendlich zu besseren Ergebnissen. Die Immobilisierung des CYP3A4 auf der Au-Elektrode mittels alternierender elektrostatischer Adsorption des Enzyms bzw. des Polyelektrolyten führte zum eindeutigen Elektronentransfer zwischen Enzym und Elektrode. Es wurde ein Reduktionspeak bei ca.  $-153$  mV (55 mV gegen NHE) und ein Oxidationspeak bei ca.  $-68$  mV (140 mV gegen NHE) gefunden. Trotz der vielen Mißerfolge hinsichtlich unterschiedlicher Immobilisierungsverfahren konnte mit diesem Verfahren eindeutig gezeigt werden, daß ein Elektronentransfer zwischen dem immobilisierten humanen P-450-Enzym und einer konventionellen Elektrode erfolgen kann. Es ist somit prinzipiell möglich, das für die Bereitstellung bzw. für die Übertragung von Redoxäquivalenten in der Natur vorhandene System aus NADPH bzw. NADH und Co-Faktoren auf elektrochemischem Wege zu ersetzen.

#### Katalytische Aktivität der CYP3A4-Elektrode

Hinweise auf die katalytische Fähigkeit der Elektroden, bei denen das Enzym elektrochemische Aktivität aufweist, wurden durch Cyclovoltammetrie bzw. Amperometrie unter Zugabe eines Substrats des Enzyms (Verapamil) gewonnen. Die Zunahme des Reduktionsstroms bei Zugabe des Substrats ist hier das Merkmal eines möglichen katalytischen Verhaltens der Elektrode. Obwohl auf der GC-GA-BSA-CYP3A4-Elektrode ein für die Katalyse notwendiger Elektronentransfer detektiert werden konnte, blieb der Hinweis für eine Umsetzung des Substrats am Enzym aus. An der mit DAE-CYP3A4-beschichteten Elektrode war der Elektronentransfer irreversibel, was natürlich keine gute Voraussetzung für eine katalysefähige Elektrode darstellt. Auch wurde hier keine Änderung des Reduktionssignals bei Anwesenheit von Substrat beobachtet. Nach Durchlauf eines Katalysezyklus liegt das Enzym wieder in seinem oxidierten Zustand vor und steht sofort an der Elektrode für seine erneute Reduktion zur Verfügung. Dies führt zu einer Zunahme des Reduktionssignals. Da eine solche Zunahme des Reduktionssignals in diesen Fällen nicht beobachtet wurde, läßt sich eine katalytische Aktivität ausschließen [Hall 1990].

Die Elektroden, auf denen das Enzym mittels Didodecyldimethylammoniumbromid (DDAB) bzw. Dimyristoylphosphatdylcholin (DMPC) jeweils als Matrix immobilisiert war, lieferten kein verwertbares Ergebnis. Die Reproduzierbarkeit der Messungen war nicht gegeben. Dies war aufgrund der ungenügenden mechanischen Stabilität dieser Filme nicht überraschend. Die katalytische Fähigkeit der Elektrode wird ermittelt, indem



das Reduktionssignal bei An- bzw. Abwesenheit von Substrat (d.h. hier: Verapamil und Sauerstoff) verglichen wird. Dabei wird der Quotient ( $I_{(\text{red,s})}/I_{(\text{red})}$ ) aus den Reduktionsströmen nach und vor der Substrat-Zugabe berechnet. Durch die mangelnde Reproduzierbarkeit war ein solcher Vergleich nicht sinnvoll. Das Rühren des Meßzelleninhalts bei der Zugabe von Substrat beschleunigt das Auswaschen des Enzyms aus der Beschichtung. Dies fiel hier durch die mangelnde Stabilität der Filme besonders ins Gewicht.

Bei der Polylysin-CYP3A4-Elektrode lag der berechnete Quotient aus den Reduktionsströmen  $I_{(\text{red,s})}/I_{(\text{red})}$  nahe 1. Dies bedeutet entweder, daß das Enzym auf der Elektrode keine katalytische Fähigkeit besitzt, oder daß die Regenerierung des Enzyms bei der Umsetzung mit dem Substrat nicht ausreichend schnell stattfindet. Die cyclovoltammetrischen und amperometrischen Untersuchungen an der PATS-, Mercaptoanilin- bzw. Cystamin-modifizierten Au-Elektrode in Anwesenheit von Sauerstoff und Substrat ergaben keine Hinweise darauf, daß das Enzym auf der Elektrode katalytisch aktiv war.

Hingegen wurde auf der PDDA-CYP3A4 beschichteten Au-Elektrode eine deutliche Zunahme des Reduktionsstroms in Anwesenheit von Sauerstoff festgestellt. Die Zunahme des Elektrodenstroms trat bei Zugabe von Substrat deutlich verstärkt auf. Dies deutet auf eine mögliche katalytische Umsetzung des Substrats am Enzym hin. Das katalytische Verhalten wird ausführlich bei der Diskussion der Charakterisierung der Enzymfilme behandelt.

### Charakterisierung der Enzymfilme

Die Charakterisierung der Enzym-Polyelektrolyt-Elektrode erfolgte mittels unterschiedlicher Methoden. Die Frequenzmessung nach jedem Adsorptionsschritt des Polyelektrolyten bzw. des Enzyms mittels QCM-Technik zeigte ein lineares Filmwachstum bis zu 10 Schichten. Die berechnete Filmdicke des Enzymfilms (ca. 40 Å) deutet auf eine monomolekulare Schichtbildung hin, da der Durchmesser von P-450 etwa im Bereich von 35-40 Å liegt [Peterson et al. 1995]. Diese Aussage ist nur gültig, wenn man annimmt, daß die Orientierung des Proteins, die Packungsdichte und die Hydratisierung des Enzyms keinen signifikanten Einfluß auf die Schichtdicke haben. [Lvov et al. 1995].

Das UV-Spektrum des CYP3A4 in Lösung zeigte die für den Enzym-CO-Komplex charakteristische Bande bei 450 nm. Dagegen konnte für CYP3A4 im Polyion-Film keine Absorptionsbande beobachtet werden. Einerseits war die Konzentration des

adsorbierten Enzyms offensichtlich zu niedrig. Die Erhöhung der Konzentration des Enzyms führte andererseits zu einer Verminderung der Lichtdurchlässigkeit der transparenten Goldfolie, die die Aufnahme des Spektrums behindert. Aus den selben Gründen führten auch die spektroelektrochemischen Untersuchungen zu keinen verwertbaren Ergebnissen.

Die Untersuchung der Elektroaktivität des Enzymfilms mittels Cyclovoltammetrie und SQW-Voltammetrie zeigte einen reversiblen Elektronentransfer zwischen Elektrode und Enzym. Dieser Elektronentransfer ermöglicht die Überführung des CYP3A4 ( $\text{Fe}^{+III}$ ) zu CYP3A4 ( $\text{Fe}^{+II}$ ) und umgekehrt. Der Reduktionspeak beim Vorwärtsscan deutet auf eine Elektronenaufnahme des Enzyms von der Elektrode hin. Der Oxidationspeak beim Rückwärtsscan liefert einen entsprechenden Hinweis auf die Elektronenabgabe des Enzyms an die Elektrode. Die verbesserte Redoxaktivität im Film im Vergleich zu jener in der Lösung ließe sich folgendermaßen erklären: Die Konzentration des Enzyms in der Nähe der Elektrode ist relativ größer, wenn dieses an der Elektrode immobilisiert ist. Durch die Immobilisierung wird die mögliche unspezifische Adsorption des Enzyms an der Elektrode und die daraus resultierende Denaturierung vermindert. Darüber hinaus könnte das Enzym in dem Film so orientiert sein, daß der Elektronentransfer begünstigt wird.

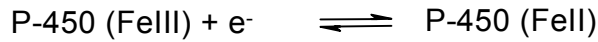
Das mit potentiometrischer Titration gemessene Mittelpunktspotential für Cytochrom P450cam (CYP101) in Lösung liegt im Bereich zwischen  $-250$  mV und  $-330$  mV gegen NHE [Sligar 1976, Peterson 1971, Guengerich 1983]. Das hier mittels Cyclovoltammetrie ermittelte Mittelpunktspotential von  $98$  mV gegen NHE für CYP3A4 unterscheidet sich von diesem Wert. Ein direkter Vergleich mit dem potentiometrisch gemessenen Redoxpotential des CYP3A4 in Lösung ist nicht möglich, weil darüber keine Daten bekannt sind. Eine Verschiebung im Mittelpunktspotential des CYP3A4-Films könnte auf die strukturellen Unterschiede in der Häm-Umgebung bzw. auf die Wechselwirkung des Enzyms mit dem Polyion zurückzuführen sein [Rusling 2000]. In der Literatur wird für das Putidaredoxin (Pdx), einem Kofaktor des CYP101, auf einer Mercaptoalkanoat-modifizierten Au-Elektrode in Anwesenheit von Polylysin ein Mittelpunktspotential  $E_m$  von  $-180$  mV gegen NHE beschrieben. Das bedeutet eine Verschiebung von  $+60$  mV gegenüber dem mittels potentiometrischer Titration erhaltenen Wert von  $-240$  mV [Avila et al. 1999]. Erklärt wird dies durch die durch Ladungsneutralisation hervorgerufene Komplexbildung des Pdx mit Polylysin [Avila et al. 1999]. Es wird postuliert, daß die Neutralisation einer negativen Ladung auf der Oberfläche eines Proteins eine Verschiebung von  $20-30$  mV hervorrufen kann [Banci et al. 1996].

Das Auftreten eines Redoxpaars erst nach einer Equilibrierungszeit von einer Stunde im Puffer könnte dadurch erklärt werden, daß der Enzymfilm möglicherweise eine vollständige Hydratisierung benötigt. Außerdem könnte durch die angelegte Spannung eine für den Elektronentransfer günstige Reorientierung des Enzyms stattfinden. Eine Reorganisation an der Oberfläche nach der Adsorption ist für Polyionen aus anderen Arbeiten bekannt [Lvov 2000]. Nach der Equilibrierungszeit konnte ein linear von der Scangeschwindigkeit abhängiger Reduktions- bzw. Oxidationsstrom gleicher Größe beobachtet werden. Dies deutet auf ein sog. „thin layer“- elektrochemisches Verhalten hin. Darüber hinaus bedeutet dies, daß alle Enzyme im elektroaktiven Anteil des Films, die beim Vorwärtsscan in die reduzierte Form überführt worden sind, beim Rückwärtsscan zurückoxidiert wurden. Da die Cyclovoltammogramme von der Mono- bzw. Multischicht-Enzymelektrode identische Peakströme lieferten, läßt sich vermuten, daß das Enzym nur in der ersten Schicht elektroaktiv ist. Analoge Beobachtungen wurden auch für andere Hämoprotein-beschichtete Elektroden gemacht [Zhang et al. 1997].

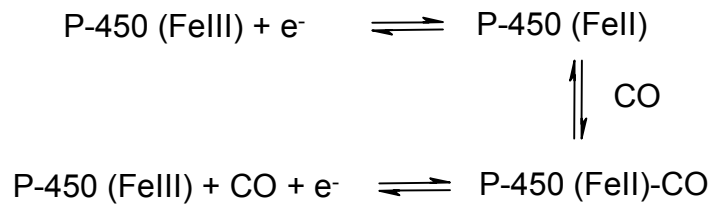
Eine Verschiebung des Redoxpotentials des CYP3A4 wurde hier in Anwesenheit von Substrat nicht beobachtet. Für CYP101 wurde eine positive Verschiebung um ca. 100 mV bis 160 mV seines Redoxpotentials bei der Bindung von Campher festgestellt [Sligar et al. 1976, Fisher et al. 1983]. Die von der Bindung von Substrat am Enzym gefolgte positive Verschiebung des Redoxpotentials ist auf den Wechsel des Spinzustandes von  $\text{Fe}^{3+}$  (Ferri) zurückzuführen. Bei der Bindung des Substrats ändert sich die Koordination des Eisens durch die Verdrängung des Wassers an der sechsten Koordinationsstelle. Dabei geht das Eisenzentrum von der sechsfachkoordinierten low-spin-Zustand zum fünffachkoordinierten high-spin-Zustand über. Da für immobilisiertes CYP3A4 keine Änderung im Mittelpunktspotential ( $E_m$ ) festgestellt wurde, kann angenommen werden, daß das Enzym im Film überwiegend im high-spin-Zustand vorliegt. Dies wiederum könnte aus einer möglichen Verdrängung des Wassers beim Immobilisierungsprozeß resultieren.

Der Einfluß von CO auf die Redoxaktivität des Enzymfilms zeigte sich darin, daß sich in dessen Anwesenheit das Redoxpotential in positive Richtung verschob. Durch die Bindung von CO ändern sich die Koordinationszahl und der Spinzustand des Eisens. Da das Redoxpotential sowohl von der Koordinationszahl als auch vom Spinzustand abhängt, könnte dies die beobachtete Verschiebung erklären.

Ohne Gegenwart von CO findet die Redoxreaktion im Verlauf eines Potentialzyklus gemäß Gleichung 9 statt.

Gleichung 9:

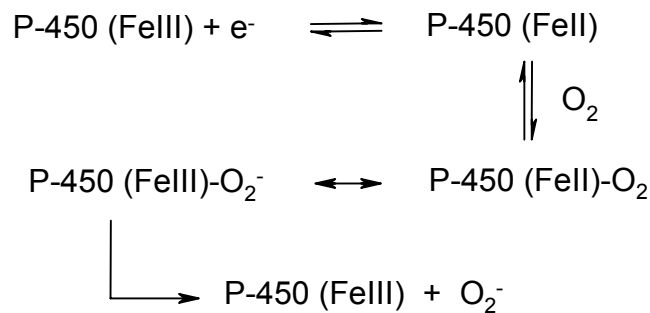
In Gegenwart von CO bildet das Enzym einen Enzym-CO-Komplex, sobald das Eisen in den reduzierten Zustand übergeht. Es kommt zur Ausbildung eines neuen Gleichgewichts (Gleichung 10).

Gleichung 10

Das entstehende neue Gleichgewicht ist natürlich auch mit einem neuen elektrochemischen Potential verbunden.

Es konnte gezeigt werden, daß der pH-Wert des Mediums im Bereich von 5,5 bis 7,5 keinen deutlichen Einfluß auf die Redoxeigenschaften des immobilisierten Enzyms nimmt. Erst über pH 7,5 verschob sich das Redoxpotential in negative und unter pH 5 in positive Richtung. Möglicherweise erfolgt bei pH-Werten über 8 die Besetzung der sechsten Koordinationsstelle durch  $\text{OH}^-$ .  $\text{OH}^-$  als relativ schwacher Ligand verursacht einen Spinwechsel vom high-spin- zum low-spin-Zustand. Unter pH 5 wird das Enzym möglicherweise verstärkt protoniert. Dabei findet sehrwahrscheinlich eine Protonierung der basischen Aminosäure-Gruppen statt. Wie weit eine Konformationsänderung in beiden Fällen vorliegt, konnte nicht untersucht werden.

In Gegenwart von Sauerstoff änderte sich das Redoxverhalten des Enzyms. Es wurde eine Zunahme des Reduktionsstroms und ein fast vollständiges Verschwinden des Oxidationsstroms beobachtet. Der Elektronentransfer ist also irreversibel und verläuft schneller. Dies läßt sich dadurch erklären, daß das Enzym direkt nach der Reduktion mit Sauerstoff einen Komplex bildet (Gleichung 11), wobei es in einem oxidierten Zustand vorliegt und damit bei der Potentialumkehr nicht mehr für die Rückoxidation zur Verfügung steht. Auch hier stellt sich durch Bildung des Enzym-Sauerstoff-Komplexes ein neues Gleichgewicht ein. Auf dieser Stufe ist eine Abspaltung des Superoxids unter Regeneration des Enzyms im oxidierten Zustand möglich [Staudt et al. 1974].

Gleichung 11

Unter aeroben Bedingungen wurde eine Zunahme des Reduktionsstroms in Anwesenheit von Verapamil bei der Cyclovoltammetrie und bei der Amperometrie beobachtet. Dies könnte dadurch erklärt werden, daß das Substrat am Enzym umgesetzt wird und sich dabei das Enzym regeneriert, wobei es im oxidierten Zustand vorliegt. Dieses steht nun für die weitere Reduktion bzw. die Bildung des Enzym-Sauerstoff-Komplexes zur Verfügung. Die Zunahme des Reduktionssignals war abhängig von der Konzentration des Substrats. Ein für die Enzymkatalyse erwarteter Sättigungseffekt wurde für Verapamil selbst bis zu einer Konzentration von 3,3 mM nicht beobachtet. Der  $K_M$ -Wert für Verapamil bei der mikrosomalen Inkubation liegt im Bereich von 60-127  $\mu\text{M}$ . Daher ist die Vermutung berechtigt, daß das Enzym im Film eine relativ niedrige Aktivität aufweist. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß die Konzentration des Verapamils im Enzymfilm niedriger ist als diejenige in der Lösung.

Der hemmende Einfluß von CO auf das katalytische Verhalten der Enzymelektrode zeigte sich durch die Abnahme des Reduktionsstroms und das Wiederauftreten des Oxidationssignals. Die Umsetzung des Substrats am Enzym wird durch Blockierung des Eisenzentrums durch CO gehemmt. Als potenter Inhibitor verhindert es die Bildung des Sauerstoff-Enzym-Komplexes. Ketoconazol, ein spezifischer Inhibitor des CYP3A4, zeigte bei der Amperometrie und bei der Cyclovoltammetrie überraschenderweise keinen hemmenden Effekt. Für diesen Befund gibt es noch keine plausible Erklärung.

Die Produktanalyse mittels LC-MS nach der Elektrolyse bestätigte die Umsetzung des Verapamils am Enzym. Wie bei der mikrosomalen Inkubation mit NADPH regenerierendem System waren D617, das dealkylierte Produkt, und Norverapamil, das demethylierte Produkt die Hauptmetabolite [Nelson et al. 1988, Kroemer et al. 1993]. Als Nebenprodukte entstanden die Metabolite D620, D702 und D703 in sehr geringen Mengen. Bei der mikrosomalen Inkubation war festzustellen, daß bei der Umsetzung des Verapamils die Metabolite D702 und D703 hauptsächlich durch die Enzyme CYP1A2, CYP2E1 und CYP2D6 gebildet werden [Kroemer et al. 1993]. Die Umsatzrate des elektrochemisch produzierten D617 bzw. Norverapamils betrug  $98 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg}$

CYP3A4)<sup>-1</sup> bzw. 82 nmol·min<sup>-1</sup>·(mg CYP3A4)<sup>-1</sup>. Bei der in verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführten mikrosomalen Inkubation wurden für D617 und Norverapamil eine Umsatzrate von 16 pmol·min<sup>-1</sup>·(mg Protein)<sup>-1</sup> und 22,6 pmol·min<sup>-1</sup>·(mg Protein)<sup>-1</sup> [Kroemer et al. 1993] bzw. 700 pmol·min<sup>-1</sup>·(mg Protein)<sup>-1</sup> und 598 pmol·min<sup>-1</sup>·(mg Protein)<sup>-1</sup> [Nelson et al. 1988] gefunden. Unter Berücksichtigung der tatsächlichen CYP3A4-Konzentration in den mikrosomalen Präparationen (etwa 7 µg/1 mg Protein) liegen die gefundenen Umsatzraten für Norverapamil und für D617 nicht zu hoch [Shimada et al. 1994]. Die Umsatzrate der elektrochemisch vermittelten P450-Katalyse (z.B. Hydroxlierung von Progesteron) lag auch in dieser Größenordnung [Faulkner et al. 1995].

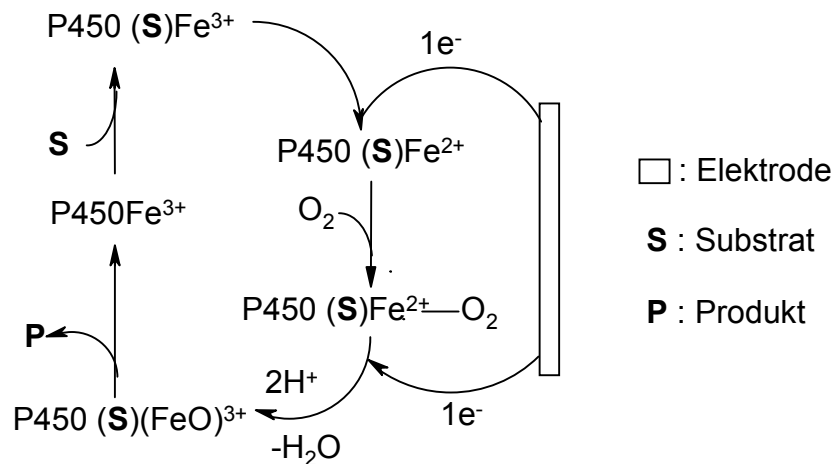
### Charakterisierung der ablaufenden Reaktionen

Die Konzentration von sowohl D617 als auch Norverapamil stieg nahezu linear mit zunehmender Elektrolysedauer (120 min) an. Dies zeigt, daß das Enzym über den gesamten Zeitraum der Elektrolyse eine konstante Aktivität aufwies.

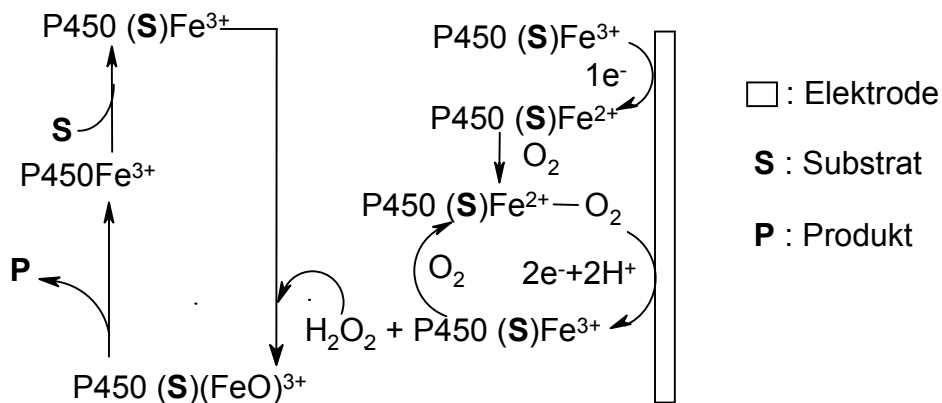
Obwohl kein hemmender Effekt von Ketoconazol auf die Katalyse bei den cyclovoltammetrischen und den amperometrischen Messungen auftrat, zeigte die Produktanalyse nach der Elektrolyse eine Reduzierung der Produktbildung um 60-70 %. Die Bindung des Ketoconazols an das Enzym verläuft offensichtlich so langsam, daß die dadurch bedingte Hemmung der Katalyse bei der cyclovoltammetrischen und der amperometrischen Messung nicht detektiert wird.

Im Gegenwart von Katalase reduziert sich die Produktbildung um etwa die Hälfte. Dies deutet auf eine Beteiligung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an der Katalyse hin. Eine Inkubation der Enzymelektrode mit Verapamil und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ohne angelegtes Potential führte zu den gleichen Hauptmetaboliten Norverapamil und D617. Jedoch war die Produktbildung bezogen auf die elektrochemisch vermittelte Enzymkatalyse um 55-60% vermindert. Eine Inkubation von Verapamil mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ohne Gegenwart von Enzym ergab nur Norverapamil als Hauptmetabolit. Eine direkte Umsetzung des Verapamils mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu signifikanten Mengen von D617 fand also nicht statt. Ferner wurde eine erhöhte Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei der Elektrolyse in Anwesenheit von Enzym gegenüber derjenigen in Abwesenheit von Enzym festgestellt. Aus diesen Beobachtungen könnten folgende Schemata für die elektrochemisch vermittelte Enzymkatalyse abgeleitet werden.

Schema1:



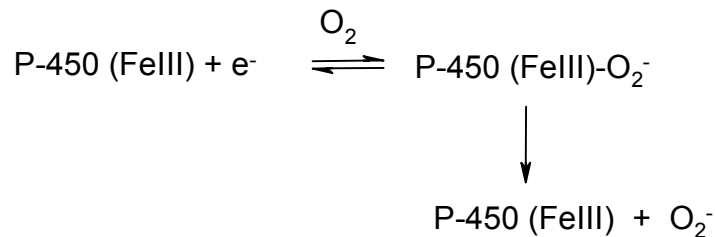
Schema2:



Schema 1 entspricht dem natürlichen Katalysezyklus, wobei die natürlichen Redoxpartner elektrochemisch ersetzt wurden. Parallel dazu scheint es einen zweiten Katalyseweg (Schema 2) zu geben. Da in Gegenwart des Enzyms eine vermehrte Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu beobachten war, konnte angenommen werden, daß eine enzymkatalysierte Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stattfindet. Onuoha et al. beobachtete eine ähnliche enzymatische Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei der in Gegenwart von Ferrylmyoglobin durchgeführten Elektrolyse [Onuoha et al. 1997]. Offensichtlich entsteht H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch die enzymatische Reduktion des Sauerstoffs direkt an der Elektrode. Eine direkte Reduktion des Sauerstoffs an der Elektrode ohne Beteiligung des Enzyms war vernachlässigbar. Das entstehende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bildet vermutlich mit dem Enzym, wie bei dem natürlichen Zyklus, den eigentlich für die Oxidation des Substrats verantwortlichen Enzym-Sauerstoff-Komplex (CYP (FeO)<sup>+3</sup>). Die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist auch als Folge der Entkopplungsreaktion beim natürlichen Katalysezyklus bekannt [Staudt et al. 1974, Zhukov et al. 1982]. Eine Bestimmung des jeweiligen Anteils den beide Reaktionen an der Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> haben, war experimentell nicht möglich.

Die mögliche Bildung von Superoxid als Folge einer weiteren Entkopplungsreaktion (Gleichung 12) ist in der Literatur beschrieben [White et al. 1980].

Gleichung 12



Da Superoxiddismutase keinen signifikanten Einfluß auf die Produktbildung hatte, läßt sich vermuten, daß hier diese Nebenreaktion bei der Katalyse vernachlässigbar ist.

Der beobachtete Sauerstoffverbrauch bei der Elektrolyse (1 Stunde) mit einer CYP3A4-Elektrode korrelierte im Rahmen der Meßgenauigkeit mit der Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Bei der in Gegenwart von Verapamil durchgeführten Elektrolyse stieg der Sauerstoffverbrauch etwa um 30% (1,12 nmol/min). Der Vergleich mit der Konzentration der gebildeten Metabolite zeigt, daß der zusätzliche Verbrauch an Sauerstoff zur Bildung der Metabolite benötigt wird. Dabei wurde berücksichtigt, daß neben der Bildung der Hauptmetabolite weitere Nebenprodukte entstehen.

Ergänzende Untersuchung der katalytischen Eigenschaften der CYP3A4-Elektrode mit weiteren CYP3A4-Substraten

Die Untersuchung der katalytischen Fähigkeit der CYP3A4-Elektrode wurde mit weiteren bekannten Substraten des CYP3A4, dem Midazolam, dem Progesteron und dem Chinidin ergänzt. Die cyclovoltammetrischen und amperometrischen Messungen zeigten auch hier eine katalytische Aktivität der CYP3A4-Elektrode. Der K<sub>M</sub>-Wert für das jeweilige Substrat übertraf den bei mikrosomaler Inkubation ermittelten um den Faktor 10 bis 100. Für Midazolam ergab sich ein K<sub>M</sub>'-Wert von 547 µM, dem 73-fachen der mikrosomalen Inkubation [Wang et al. 1999, Ghosal et al. 1996]. Progesteron zeigte einen K<sub>M</sub>'-Wert von 1082 µM, was einem 12-fachen der mikrosomalen Inkubation entspricht [Yamazaki et al. 1997]. Während bei mikrosomaler Inkubation für Chinidin ein K<sub>M</sub>-Wert von 4 µM angegeben wird, wurde er hier zu 271 µM bestimmt [Ngui et al. 2000]. Der beobachtete scheinbare Affinitätsverlust kann möglicherweise auf eine Schädigung durch die Immobilisierung des Enzyms zurückgeführt werden. Die für die Verapamil-Metabolite gefundene Umsatzrate widerlegt jedoch diese Annahme.



Vielmehr scheint die effektive Konzentration des Substrats im Film gegenüber der Lösung stark vermindert. Dies würde die beobachteten hohen  $K_M$ -Werte erklären.

Die Produktanalyse beim Midazolam nach der Elektrolyse mittels LC-MS bestätigte hier wie auch beim Verapamil die Umsetzung des Substrats am Enzym. Als Hauptmetabolite entstanden wie auch bei der mikrosomalen Inkubation 4-Hydroxy-MDZ sowie 1'-Hydroxy-MDZ. Der Verlauf der Produktbildung mit der Zeit zeigte eine nahezu lineare Abhängigkeit. Dies läßt darauf schließen, daß die Aktivität der Enzymelektrode während der Elektrolysedauer konstant blieb. Die berechnete Umsatzrate aus dem gesamten 4-Hydroxy- bzw. 1'-Hydroxy-MDZ betrug  $1,95 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg CYP3A4}^{-1}$  für 4-Hydroxy-MDZ und  $11,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg CYP3A4}^{-1}$  für 1'-Hydroxy-MDZ. Bei der mit gleicher Midazolam-Konzentration durchgeführten Elektrolyse an einer Au-PDDA-Elektrode zeigte sich, daß die beiden Hauptmetabolite offensichtlich in einem nicht vernachlässigbaren Maße auch auf rein elektrochemischem Wege gebildet werden. Die Produktanalyse ergab Konzentrationen von 12 nM für das 4-Hydroxy-MDZ und 57 nM für das 1'-Hydroxy-MDZ. Dies entspricht einem Produktanteil von 26% bzw. 21% gemessen an der Umsetzung des Midazolams an der CYP3A4-Elektrode. Diese direkte Umsetzung des Midazolams ist insofern überraschend, da bei der Cyclovoltammetrie Midazolam keinerlei Elektroaktivität zeigte. In Gegenwart von Ketoconazol trat erwartungsgemäß eine Hemmung des Umsatzes von Midazolam an der CYP3A4-Elektrode auf [Wrighton et al. 1994]. Ebenso bestätigte auch hier der verminderte Umsatz des Midazolams in Anwesenheit von Katalase die oben beschriebene Beteiligung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  am Katalysezyklus. Die Verminderung des Umsatzes war jedoch nicht so ausgeprägt wie im Falle des Verapamils. Eine Inkubation von Midazolam mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  ohne Enzym führte zu keiner Metaboliten-Bildung; in Gegenwart der Enzymelektrode ohne angelegtes Potential kam es zu einer nur sehr schwach ausgeprägten Bildung von 4-Hydroxy- und 1'-Hydroxy-MDZ. Die Anwesenheit von SOD führte zu einer erhöhten Bildung des 1'-Hydroxy-MDZ. Gleichzeitig nahm die Bildung des 4-Hydroxy-MDZ etwas ab. SOD dient dazu, das bei der möglichen Entkopplungsreaktion entstehende Superoxid abzufangen. Da das Enzym bei der Elektrolyse ohne SOD eine konstante Aktivität aufwies, kann ein protektiver Einfluß von SOD auf das Enzym ausgeschlossen werden. Möglicherweise kann entstehendes Superoxid mit den gebildeten Metaboliten weiterreagieren; inwieweit dies zutrifft, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt. Die Disproportionierung von Superoxid durch Superoxiddismutase führt zur vermehrten Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Diese vermehrte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung kann nur dann zu einer vermehrten Produktbildung führen, wenn der zweite Weg im Katalyse-Schema schneller abläuft (siehe Schema 2). Die Inkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zeigte aber, das dies nicht der Fall ist.

Die Produktanalyse der Elektrolyse mit höherer Konzentration von Midazolam (500  $\mu\text{M}$ ) zeigte, daß die Bildung der beiden Hauptmetabolite deutlich geringer war als die bei der Elektrolyse mit niedrigerer Konzentration (50  $\mu\text{M}$ ). Während die Bildung des 4-Hydroxymidazolams sich um 50 % reduzierte, nahm die Bildung des 1'-Hydroxymidazolams um fast 90% ab. Auch bei der mikrosomalen Inkubation des Midazolams beobachteten Ghosal et al. eine verminderte Bildung des 1'-Hydroxymidazolams bei höherer Midazolamkonzentration [Ghosal et al. 1996]. Ferner könnte die unterschiedliche Aktivität der in beiden Fällen verwendeten Elektroden für die beobachteten Unterschiede in der Metabolitenbildung eine Rolle spielen.

### Übertragung der Methoden auf CYP2D6

Die Übertragung der Immobilisierungstechnik mittels alternierender elektrostatischer Adsorption auf das CYP2D6 verlief erfolgreich. Auf der Au-MPS-PDDA-CYP2D6-Elektrode wurden keine Redoxpeaks detektiert. Da keine Angaben über den isoelektrischen Punkt in der Literatur verfügbar sind, ist die Nettoladung des Enzyms unbekannt. Da auf der mit zusätzlichem anionischen Polyelektrolyten (PSS) beschichteten Elektrode CYP2D6 Redoxaktivität zeigte, kann angenommen werden, daß die Nettoladung des CYP2D6 bei pH 7,4 positiv ist.

Das aus den cyclovoltammetrischen Messungen ermittelte Mittelpunktspotential betrug ca.  $-321$  mV gegen Ag/AgCl. Der mittels SQW-Voltammetrie ermittelte Wert stimmt mit diesem Ergebnis gut überein. Die Peakdifferenz zwischen dem Reduktionspeak und dem Oxidationspeak liegt im Bereich von 98 mV bis 121mV. Dies bedeutet eine Abweichung vom reversiblen Redoxverhalten. Andererseits ist die für einen reversiblen Elektronentransfer berechnete Peakdifferenz von 59 mV rein theoretischer Natur. Die lineare Abhängigkeit der Peakströme von der Quadratwurzel der Scangeschwindigkeit deutet im Gegensatz dazu auf einen reversiblen Elektronentransfer hin.

Die Untersuchungen der katalytischen Fähigkeit der CYP2D6-Elektrode mittels CV und Amperometrie in aeroben Medium zeigten, daß in Anwesenheit von Dextromethorphan die Reduktionsströme mit der Substratkonzentration zunahm. Die kinetische Berechnung für die amperometrisch gewonnenen Daten ergaben für Dextromethorphan einen  $K_M'$ -Wert von 189  $\mu\text{M}$ . Der bei mikrosomaler Inkubation ermittelte  $K_M$ -Wert liegt bei 8,7  $\mu\text{M}$  [Rodrigus 1996].

Bei den Untersuchungen mit den CYP2D6- und den CYP3A4-Elektroden waren die ermittelten  $K_M'$ -Werte für die eingesetzten Substrate sehr hoch. Dagegen liegt die Umsatzrate für Verapamil und Midazolam in einem mit der mikrosomalen Inkubation

vergleichbaren Bereich. Eine Aktivitätsverminderung des Enzyms durch die Immobilisierung scheint daher weniger wahrscheinlich. Vielmehr scheint die effektive Konzentration des Substrats im Film gegenüber der Lösung stark vermindert.

Nicht unerwähnt bleiben sollte, daß die Arbeit mit den beschriebenen Enzymelektroden nicht unproblematisch ist. So waren nur etwa 20% der hergestellten Enzymelektroden elektroaktiv. Während frisch hergestellte Elektroden sieben bis zehn Tage stabil blieben, zeigten die Elektroden schon nach 5-6 stündigem Dauereinsatz Stabilitätsprobleme. Die Aktivität der einzelnen Elektroden differierte.

Trotz dieser Einschränkungen können aus den vorliegenden Untersuchungen folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

- Ein direkter Elektronentransfer zwischen humanen P450-Enzymen und einer Elektrode ist möglich.
- Die für die P-450 vermittelte Katalyse notwendigen Elektronen können elektrochemisch bereitgestellt werden.
- Die Identifizierung möglicher Substrate des CYP3A4 bzw. CYP2D6 ist durch die entsprechenden Enzymelektroden prinzipiell möglich.

## Zusammenfassung

Cytochrom P-450-Enzyme sind Hämproteine, die zentrale Reaktionen im Metabolismus von Arzneimitteln und anderen lipophilen Fremdstoffen katalysieren. Die Charakterisierung von Fremdstoffen als Substrate oder Inhibitoren dieser Enzyme beim Menschen ist daher für die Arzneimitteltherapie von großer Bedeutung. Dafür bietet sich aufgrund der Redox-Eigenschaften dieser Enzyme die Verwendung von amperometrischen Biosensoren als Alternative zu herkömmlichen Methoden an. Zur Entwicklung eines Biosensors wurden zunächst verschiedene Immobilisierungsverfahren mit rekombinantem CYP3A4 des Menschen getestet. Die Adsorption wurde mit einer Quarz-Kristall-Mikrowaage (QCM) verfolgt. Die Redox-eigenschaften und das katalytische Verhalten dieser Elektroden wurden mit Cyclovoltammetrie, Amperometrie und Produktanalyse untersucht.

Als Verfahren der Wahl erwies sich die Immobilisierung mittels alternierender elektrostatischer Adsorption von Polykationen und dem Enzym auf Goldelektroden. Die Untersuchungen mit der QCM-Technik zeigten ein lineares Filmwachstum. Es wurde eine mittlere Massenbeladung von  $1400 \text{ pmol/cm}^2$  und eine Schichtdicke von  $40 \text{ \AA}$  für CYP3A4 auf der Elektrode ermittelt. Cyclovoltammetrisch wurde für CYP3A4 ein Mittelstufenpotential (Mittelwert $\pm$ Absoluter Fehler) von  $98 \pm 5 \text{ mV}$  gegen die Normal-Wasserstoff-Elektrode (NHE) bestimmt. Die Integration des Reduktionspeaks zeigte, daß 70% des immobilisierten CYP3A4 elektroaktiv waren. In Gegenwart des Substrats Verapamil zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme des Reduktionsstroms, was auf eine katalytische Aktivität der Elektrode hinweist. Die Produktanalyse für Verapamil mittels LC-MS ergab eine Umsatzrate von  $98 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg CYP3A4})^{-1}$  bzw.  $82 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg CYP3A4})^{-1}$  für die Hauptmetabolite D617 bzw. Norverapamil. Ferner zeigte die Produktanalyse eine Hemmung der Metabolitenbildung in Gegenwart des CYP3A4-Inhibitors Ketoconazol und einen Beitrag von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zum Katalysezyklus. Ergänzende Untersuchungen mit weiteren CYP3A4-Substraten (Midazolam, Progesteron bzw. Chinidin) bestätigten die katalytische Fähigkeit des Biosensors. Die scheinbaren  $K_M'$ -Werte übertrafen für alle Substrate die für mikrosomale Inkubationen veröffentlichten Werte um etwa zwei Größenordnungen.

Der Versuch einer Übertragung des Immobilisierungsverfahrens auf das CYP2D6 des Menschen war erfolgreich. Für CYP2D6 konnte ein Redoxpaar mit einem Mittelpunktspotential von  $-113 \pm 5 \text{ mV}$  gegen NHE ermittelt werden. In Gegenwart eines Substrats (Dextromethorphan) wurde auch hier eine konzentrationsabhängige Zunahme des Reduktionsstroms mit einem entsprechend hohen  $K_M'$ -Wert beobachtet.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte damit gezeigt werden, daß die wesentlichen Voraussetzungen für die Entwicklung eines amperometrischen Cytochrom P-450-Biosensors erfüllt sind.

## **7 Literaturverzeichnis**

1. Albery WJ and Craston DH (1987).  
Amperometric enzyme electrodes, theory and experiment. Fundamental and Applications; Turner APF, Karube I, and Wilson S (Eds.), first edition, Oxford Univ. Press, New York:110-180.
2. Allen PM, Hill HAO and Walton NJ (1984).  
Surface modifiers for the promotion of direct electrochemistry of cytochrome c. J. Electroanal. Chem., 178:69-86.
3. Avila L, Wirtz M, Bunce RA and Rivera M (1999).  
An electrochemical study of the factors responsible for the modulating the reduction potential of putidaredoxin. J. Bioinorg. Chem., 4:664-674.
4. Banci L, Bertinin I, Savellini GG and Luchinat C (1996).  
Individual reduction potentials of the iron ions in Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> and high-potential Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> ferredoxins. Inorg. Chem., 35:4248-4254.
5. Bartlett PN and Cooper JM (1993).  
A review of the immobilisation of enzymes in electropolymerized films. Electroanal. Chem., 362:1-12.
6. Baymann F, Moss DA and Mäntle W (1991).  
An electrochemical assay for the characterization of redox protein from biological electron transfer chains. Anal. Biochem., 199:269-274.
7. Bilitewski U, Rüger P and Schmid RD (1991).  
Glucose biosensors based on thick film technology. Biosen. Bioelectron., 6:369-373.
8. Black SD and Coon MJ (1987).  
P-450 cytochromes: Structure and function. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 60:35-87.

9. Brett AMO and Brett CMA (1993).  
Electrochemistry: Principles, Methods and Applications, Oxford Press, New York:310-324.
10. Brøsen K (1995).  
Drug interactions and the cytochrom P-450 system.  
Clin. Pharmacokin., 29 (suppl. 1):20-25.
11. Cardosi MF and Turner APF (1987).  
The realization of electron transfer from biological molecules to electrodes.  
Biosensors, Fundamental and Applications; Turner APF, first edition, Karube I, and Wilson S (Eds.), Oxford Univ. Press, New York:257-275.
12. Champion PM, Stallard BR, Wagner GC, and Gunsalus IC (1982).  
Resonance raman detection of an Fe-S bond in cytochrome.  
J. Am. Chem. Soc., 104:5469-5473.
13. Charles RM, Rubinstein I and Bard AJ (1982).  
Polymer films on electrodes. Electrones and mass transfer in nafion films containing  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ .  
J. Am. Chem. Soc., 104:4817-4824.
14. Cooper JM, Greenough KR and McNeil CJ (1993).  
Direct electron transfer reactions between immobilized cytochrome c and modified gold electrodes.  
J. Electroanal. Chem., 347:267-275.
15. Creighton TE (1990).  
Protein structure, a practical approach; Creighton TE (Ed.), first edition, IRL Press: Oxford, New York, Tokyo:43-55.
16. Dawson JH (1988).  
Probing structure-function relationships in heme-containing oxygenase and peroxidase.  
Science, 240:433-439.

17. Decher G, Lehr B, Lowack K, Lvov Y and Schmitt J (1994).  
New nanocomposite films for biosensors: Layer-by-layer adsorbed films of poly-electrolytes, proteins or DNA.  
Biosens. Bioelectron., 9:677-684.
18. Estabrook RW, Faulkner KM, Shet MS and Fisher CW (1996).  
Application of electrochemistry for P-450-catalyzed reactions.  
Meth. Enzymol., 272:44-50.
19. Faßbender M (1997).  
Ein Pharmakophor-Modell für Substrate und Inhibitoren der menschen P-450-Isoform1A2.  
Dissertation, Technische Universität München.
20. Faulkner KM, Shet MS, Fisher CW and Estabrook RW (1995).  
Electrochemically driven  $\omega$ -hydroxylation of fatty acids using cytochrome P-450 4A1.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7705-7709.
21. Fisher MT and Sligar SG (1983).  
Control of heme redox potential and reduction rate: A linear free energy relation between potential and ferric spin state equilibrium.  
J. Am. Chem. Soc., 107:5361-5363.
22. Fuhr U, Weiss M, Kroemer HK, Neugebauer G, Rameis H, Weber W and Woodcock BG (1996).  
Systematic screening for pharmacokinetic interactions during drug development.  
Int. J Clin. Pharmacol. Ther., 34:139-151.
23. Gacesa P und Hubble J (1992).  
Enzymtechnologie, 1. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, New York:92-100.
24. Ghosal A, Satoh H, Thomas PE, Bush E and Moore D (1996).  
Inhibition and kinetics of cytochrome P4503A4 activity in microsomes from rat, human and cDNA-expressed human cytochrome P450.  
Drug. Metab. Dispos., 24(9): 940-947.

25. Greet R, Peat R, Peter LM, Pletcher D and Robinson J (1990).  
Instrumental methods in electrochemistry, Ellis Horwood series in Physical Chemistry, Kemp TJ (Ed.), first edition, New York, London:178-180.
26. Guengerich FP (1983).  
Oxidation - reduction properties of rat liver cytochromes P-450 and NADPH-Cytochrome P-450 reductase related to catalysis in reconstituted systems.  
Biochem., 22:2811-2820.
27. Guengerich FP and Shimada T (1991).  
Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes.  
Chem. Res. Toxicol., 4:391-407.
28. Guengerich FP (1996).  
In vitro techniques for studying drug metabolism.  
J. Pharmacokinet. Biopharm., 24:521-533.
29. Guengerich FP (1999).  
Cytochrome P-450 3A4: Regulation and role in drug metabolism.  
Annu. Rev. Pharmacol., 39:1-17.
30. Gunsalus IC (1968).  
A Soluble methylene hydroxylase system: Structure and role of cytochrome P-450 and iron-sulfur protein components.  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 349 (XI):1610-1613.
31. Hall EAH (1990).  
Biosensors in Practice  
Biosensors, Hall EAH (Ed.), Open University Press, New York:108-158.
32. Hanzlik J, Bianco P and Haladjian J (1995).  
Voltammetric behavior of positively charged species at a pyrolytic graphite electrode modified with lauric acid.  
J. Electroanal. Chem., 380:287-290.
33. Heiduschka P, Göpel W, Beck W, Kraas W, Kienle S and Jung G (1996).  
Microstructured peptide-functionalised surfaces by electrochemical



polymerisation.

Chem. Eur. J., 2:667-672.

34. Heineman WR, Meckstroth ML, Norris BJ und Su C (1979).  
Optically transparent thin layer electrode techniques for the study of biological redox systems.  
Bioelectro. Bioenerg., 6:577-585.
35. Heinz J (1984).  
Cyclovoltammetrie –die „Spektroskopie“ des Elektrochemikers.  
Angew. Chem., 6: 823-840.
36. Higgins IJ and Lowe CR (1987).  
Introduction to the principles and applications of biosensors  
Phil. Trans. R. Soc. London (B316),16:3-11.
37. Ingelman-Sundberg M and Hagbjork AL (1982).  
On the significance of the cytochrome P-450-dependent hydroxyl radical-mediated oxygenation mechanism.  
Xenobiotica, 12(11):673-86.
38. Iwuoha E, Joseph S, Zhang Z, Smyth MR, Fuhr U and Ortiz de Montellano PR (1998).  
Drug metabolism biosensors: Electrochemical reactivities of cytochrome P-450cam immobilised in synthetic vesicular systems.  
J. Pharm. Biomed. Anal., 17:1101-1110.
39. Janata J (1989).  
Principles of chemical sensors, In Modern Analytical Chemistry, first edition, Plenum Press, New York:175-256.
40. Johnsson B, Löfas S and Lindquist G (1991).  
Immobilization of proteins to a carboxymetyldextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors.  
Anal. Biochem., 198:268-77.

41. Joseph S, Iwuoha E, Zhang Z, Smyth MR, Ortiz de Montellano PR and Fuhr U (1997)  
Amperometric biosensors for cytochrome P-450cam.  
FASEB. J. 11, A814.
  
42. Kaminsky LS and Fasco MJ (1992).  
Small intestinal cytochromes P-450.  
Crit. Rev. Toxicol., 21:407-422.
  
43. Kazlauskaite J, Westlake ACG, Wong LL and Hill HAO (1996).  
Direct electrochemistry of cytochrome P-450cam.  
Chem. Commun., 1:2189-2190.
  
44. Klingenberg M (1958).  
Pigments of rat liver microsomes.  
Arch. Biochem. Biophys., 75:376-386.
  
45. Kolars JC, Awni WM, Merion RM, and Watkins PB (1991).  
First-pass metabolism of cyclosporin by the gut.  
Lancet, 338:488-1490.
  
46. Kroemer HK, Gautier JC, Beaune P, Henderson C, Wolf CR and Eichelbaum M (1993).  
Identification of P450 enzymes involved in metabolism of verapamil in humans.  
Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol., 348:332-337.
  
47. Löfas S and Johnsson B (1990).  
A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilisation of ligands.  
J. Chem. Soc. Chem. Comm., 8:1526-1528.
  
48. Lötzbeyer T, Schumann W, Katz E, Falter J and Schmidt TL (1994).  
Direct electron transfer between the covalently immobilized enzyme microperoxidase MP-11 and a cystamin-modified gold electrode.  
J. Electroanal. Chem., 377:291-294.

49. Lvov Y, Ariga K, Ichinose I and Kunitake T (1995).  
Assembly of multicomponent protein by means of electrostatic layer-by-layer adsorption.  
J. Am. Chem. Soc., 117:617-623.
50. Lvov YM, Lu Z, Schenkman JB, Zu X and Rusling JF (1998).  
Direct electrochemistry of myoglobin and cytochrome P-450cam in alternate layer-by-layer films with DNA and other polyanions.  
J. Am Chem. Soc., 120:4073-4080.
51. Lvov YM (2000).  
Protein Architecture: Interfacing molecular assemblies and immobilization.  
Biotechnology; (Eds.) Mohwald, H. and Lvov Y.M, Marcel Dekker, New York:125-167.
52. Michaelis L und Menten ML (1913).  
Die Kinetik der Invertinwirkung.  
Biochem., 49:333-369.
53. Nakahara K, Tanimoto T, Hatano K, Usuda K and Shoun H (1993).  
Cytochrome P450 55A1 (P450dNIR) acts as nitric oxide reductase employing NADH as the direct electron donor.  
J. Biol. Chem., 268:8350-8355.
54. Nassar AF, Narikiyo Y, Sagara T und Nakashima N (1995).  
Electrochemical properties of myoglobin embedded in Langmuir-Blodgett and cast films of synthetic lipids.  
J. Chem. Soc. Faraday Trans., 91:1775-1782.
55. Nelson WL and Olsen LD (1988)  
Regiochemistry and enantioselectivity in the oxidative N-dealkylation of verapamil.  
Drug. Metab. Disp., 10(6):834-841.
56. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC and Berbert DW (1996).  
P-450 superfamily: Update on new sequences, gen mapping, accession numbers and nomenclature.  
Pharmacogenetics, 6:1-42.

57. Nelson DR (2000).  
Cytochrom P-450 family count.  
<http://drnelson.utmem.edu/famcount.html>.
58. Ngui JS, Tang W, Stearns RA, Shou M, Miller RR, Zhang Y, Lin JH, and Baillie TA (2000).  
Cytochrome P450 3A4-mediated interaction of diclofenac and quinidine.  
Drug Metab. Dispos., 28(9):1043-50.
59. Nuzzo RG and Allara DL (1983).  
Adsorption of bifunctional organic disulphides on gold surfaces.  
J. Am. Chem. Soc., 105:4481-4483.
60. Omura T and Sato R (1962).  
A new cytochrome in liver microsomes.  
J. Biol. Chem., 237:1375-1376.
61. Omura T and Sato R (1964a).  
The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature.  
J. Biol. Chem., 239:2370-2378.
62. Omura T and Sato R (1964b).  
The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. solubilization, purification and properties.  
J. Biol. Chem., 239:2378-2385.
63. Omura T, Sato R, Cooper DY, Rosenthal O and Estabrook RW (1965)  
Function of cytochrome P-450 of microsomes.  
Fed. Proc., 24(5):1181-1189.
64. Onuoha AC, Zu X and Rusling JF (1997).  
Electrochemical generation and reactions of ferrylmyoglobins in water and microemulsion.  
J. Am. Chem. Soc., 119:3979-3986.

65. Ortiz de Montellano PR, Kunze KL and Beilan HS (1983).  
Chiral orientation of prosthetic heme in the cytochrome P-450 active site.  
J. Biol. Chem., 258:45-48.
66. Ortiz de Montellano PR (1995).  
Oxygen activation and reactivity.  
Cytochrome P-450: structure, mechanism, and biochemistry, Ortiz de Montellano (Ed.), second edition, Plenum Press, New York:245-303.
67. Paulus TL (1986).  
The crystal structure of cytochrome P-450cam.  
Cytochrome P-450: structure, mechanism, and biochemistry, Ortiz de Montellano (Ed.), second edition, Plenum Press, New York:505-523.
68. Peterson AJ and Graham-Lorence SE (1995).  
Bacterial P450s: Structural similarities and functional Differences.  
Cytochrome P-450: structure, mechanism, and biochemistry, Ortiz de Montellano (Ed.), Second Edition, Plenum Press, New York:154-155.
69. Peterson JA (1971).  
Camphor binding by pseudomonas putida cytochrome p-450.  
Arch. Biochem. Biophys., 144:678-693.
70. Pittner F (1987).  
Construction of electrochemical biosensors.  
Biosensors: Fundamentals and Applications; Turner APF, Karube I, and Wilson S (Eds.), first edition, Oxford Univ. Press, New York:44-51.
71. Polzius R, Schneider T, Bier FF, Bilitewski U and Koschinski W (1996).  
Optimization of biosensing using grafting couplers: Immobilization on tantalum oxide waveguides.  
Biosens. Bioelectron., 11:503-514.
72. Pritchard MP, Ossetian R, Li DN, Henderson CJ, Burchell B, Wolf CR and Friedberg T (1997).  
A general strategy for the expression of recombinant human cytochrome P450s in Escherichia coli using bacterial signal peptides: Expression of CYP3A4, CYP2A6, and CYP2E1.  
Arch. Biochem. Biophys., 345(2):342-54.

73. Rickert J, Weiss T, Kraas W, Jung G and Goepel W (1996).  
A new affinity biosensor: Self-assembled thiols as selective monolayer coatings of  
Quarz crystal microbalances.  
Biosens. Bioelectron., 11:591-598.
74. Rodrigues AD (1996)  
Measurement of human liver microsomal cytochrome P450 2D6 activity using [O-  
methyl-<sup>14</sup>C]dextromethorphan as substrate.  
Methods. Enzymol., 272:186-95.
75. Rusling JF (2000).  
Protein Architecture: Interfacing Molecular Assemblies and Immobilization.  
Biotechnology; (Eds.) Mohwald H and Lvov YM, Marcel Dekker, New York:337-  
354.
76. Sauerbrey GZ (1959).  
Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur  
Mikrowägung.  
Z. Physik, 155:206-222.
77. Sawyer DT (1995).  
Electrochemistry for chemists: Indicator electrodes; Sawyer DT (Ed.), Sobkowiak  
A and Roberts JL, second edition, John Wiley & Sons, New York:189-190.
78. Schmid RD, Billitewsky U and Rüger P (1991).  
Glucose biosensors based on thick film technology.  
Biosens. Bioelec., 6:369-373.
79. Shannon RD and Prewitt CT (1970).  
Revised values of effective ionic radii.  
Acta. Cryst., B26:1046-8.
80. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y and Guengerich FP (1994)  
Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in  
the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver  
microsomes of 30 japanese and 30 caucasians.  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 270(1):414-23.

81. Sligar SG (1976).  
Coupling of spin, substrate and redox equilibria in cytochrome P-450.  
Biochemistry, 15:5399-5406.
82. Sligar SG and Gunsalus IC (1976).  
A thermodynamic model of regulation: Modulation of redox equilibria in camphor monooxygenase.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73:1078-1082.
83. Smith RL, Idle JR, Mahgoub AA, Sloan TP and Lancaster R (1978).  
Genetically determined defects of oxidation at carbon centers of drugs.  
Lancet, 1: 943-944.
84. Staudt H, Lichtenberger F and Ullrich V (1974).  
The role of NADH in uncoupled microsomal monooxygenations.  
Eur. J. Biochem. 46:99-106.
85. Testa B and Cadwell J (1995).  
The metabolism of drug and other xenobiotics: Biochemistry of redox reactions,  
Testa B and Cadwell J (Eds.), Academic Press, London:122-297.
86. Von Richter O, Eichelbaum M, Schonberger F and Hofmann U (2000).  
Rapid and highly sensitive method for the determination of verapamil, [2H7]  
verapamil and metabolites in biological fluids by liquid chromatography-mass  
spectrometry.  
J. Chromatogr. B., 738(1):137-47.
87. Wang JS, Wen X, Backman JT, Taavitsainen P, Neuvonen PJ and Kivisto KT  
(1999)  
Midazolam alpha-hydroxylation by human liver microsomes in vitro: inhibition by  
calcium channel blockers, itraconazole and ketoconazole.  
Pharmacol. Toxicol., 85(4):157-61.
88. Warriner K, Higson S, Christle I, Ashworth D and Vadgama P (1996).  
Electrochemical characteristics of two model electropolymerised films for enzyme  
electrodes.  
Biosens. Bioelectron., 11 (6/7):615-623.

89. White RE and Coon MJ (1980).  
Oxygen activation by cytochrome P-450.  
Annu. Rev. Biochem., 49:315-356.
90. Willner I, Katz E and Lapidot N (1992).  
Bioelectrocatalyzed reduction of nitrate utilizing polythiophene bipyridinium  
enzyme electrodes.  
Bioelectrochem. Bioenerg., 29:29-45.
91. Wolff T, Distlerath LM, Worthington MT, Groopman JD, Hammons GJ, Kadlubar  
FF, Prough RA, Martin MV and Guengerich FP (1985).  
Substrat specificity of human liver cytochrome P 450 debrisoquinone 4-hydroxy-  
lase probed using immunochemical inhibition and chemical modeling.  
Cancer Res., 45:2116-2122.
92. Wrighton SA and Ring BJ (1994).  
Inhibition of human CYP3A catalyzed 1'-hydroxy midazolam formation by  
ketoconazol, nifedipine, erythromycin, cimetidine and nizatidine.  
Pharm. Res., 11:921-924.
93. Wrighton SA, Vanden Branden M and Ring BJ (1996).  
The human drug metabolizing cytochromes P-450.  
J. Pharmacokinet. Biopharm., 24:461-473.
94. Yamazaki H and Shimada T (1997).  
Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9,  
and 3A4 in human liver microsomes.  
Arch. Biochem. Biophys., 346(1):161-9.
95. Zhang Z, Nassar AEF, Lu Z, Schenkman JB and Rusling JF (1997).  
Direct electron injection from electrodes to cytochrome P-450cam in  
biomembrane -like films.  
J. Chem. Soc. Faraday Trans., 93:17691774.
96. Zhukov AA and Archakov AI (1982).  
Complete stoichiometry of free NADPH oxidation in liver microsomes.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 109:813-818.



## **8 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Häm-Zentrum des P-450. Blau: Eisen, Rot: Sauerstoff, Gelb: Schwefel, Türkis: Stickstoff; die Wasserstoffatome sind nicht eingezeichnet.-----	9
Abbildung 2: Abbauweg des Verapamils durch Cytochrom P-450. -----	12
Abbildung 3: Elektronenübertragungswege in unterschiedlichen P-450-Systemen. -----	14
Abbildung 4: Der für das Cytochrom P-450 vorgeschlagene Katalysemechanismus.-----	15
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Biosensors. -----	16
Abbildung 6: Schematische Darstellung der kovalenten Bindung an einer modifizierten Elektrode.-----	25
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Chloranil-Enzymelektrode.-----	26
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Succinanhidrid-Enzymelektrode. -----	27
Abbildung 9: Schematische Darstellung des schichtweisen Aufbaus durch elektrostatische Adsorption. -----	30
Abbildung 10: Eine typische Meßzelle. Die Abkürzungen sind im Text erläutert.-----	33
Abbildung 11: Aufbau einer OTTLE-Zelle. A: Verstärker. Abkürzungen siehe Text. -----	37
Abbildung 12: Cyclovoltammogramm einer GC- (a) bzw. Au-Elektrode (b) in 2 $\mu\text{M}$ CYP3A4 in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl (pH=7,4). Scanrate: 100 mV/s. -----	48
Abbildung 13: Cyclovoltammogramm einer GC-Elektrode in 2 $\mu\text{M}$ CYP3A4 in sauerstoffhaltigem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl (pH=7,4). Scanrate: 100 mV/s. -----	48
Abbildung 14: Cyclovoltammogramme von Kobaltsepulchrat an einer PG-DDAB-CYP3A4-Elektrode in (a) sauerstofffreiem , (b) sauerstoffhaltigem (c) sauerstoff- und substrathaltigem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl (pH=7,4). Scanrate: 100 mV/s.-----	53
Abbildung 15: Cyclovoltammogramm einer PG-BSA-GA-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s.-----	55
Abbildung 16: Cyclovoltammogramm einer PG-DAE-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s. -----	56
Abbildung 17: Cyclovoltammogramm einer PG-DDAB-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s. -----	56
Abbildung 18: Cyclovoltammogramm einer PG-DMPC-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s. -----	56
Abbildung 19: Cyclovoltammogramm einer PG-PLL-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s. -----	57
Abbildung 20: Cyclovoltammogramm einer GC-BSA-GA-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s.-----	58
Abbildung 21: Cyclovoltammogramm einer GC-DDAB-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s. -----	58
Abbildung 22: Cyclovoltammogramm einer GC-DMPC-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s. -----	58
Abbildung 23: Cyclovoltammogramm einer ITO-DDAB-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s. -----	59
Abbildung 24: Cyclovoltammogramm einer ITO-DMPC-CYP3A4-Elektrode in sauer-	

stofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s. -----	59
Abbildung 25: Cyclovoltammogramm einer ITO-PLL-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s. -----	60
Abbildung 26: Cyclovoltammogramm einer Au-Cystamin-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s. -----	61
Abbildung 27: Cyclovoltammogramm einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s. -----	61
Abbildung 28: Cyclovoltammogramm einer Au-PATS-CYP3A4-Elektrode in 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s. -----	62
Abbildung 29: Frequenzänderung der Quarzresonator-Goldelektrode in Abhängigkeit von der Zahl der Adsorptionsschritte. -----	64
Abbildung 30: Das Differenzspektrum eines im Phosphatpuffer suspendierten CYP3A4-Enzyms. -----	65
Abbildung 31: Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-Elektrode (a) ohne CYP3A4-Beschichtung (b) mit CYP3A4-Beschichtung in Phosphatpuffer mit 100 mM KCl (pH=7,4). -----	66
Abbildung 32: Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode bei verschiedenen Scangeschwindigkeiten (a): 50 mV/s, (b):100 mV/s, (c):200 mV/s,(d):300mV/s, (e):400 mV/s, (f):500 mV/s und (g):600 mV/s) in Phosphatpuffer mit 100 mM KCl (pH=7,4). -----	66
Abbildung 33: Die mit der Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode gemessenen Redoxströme in Abhängigkeit von der Wurzel der Scangeschwindigkeiten. -----	67
Abbildung 34: SQW-Voltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode bei verschiedenen Frequenzen (100 Hz, 200 Hz und 600 Hz) in Phosphatpuffer mit 100 mM KCl (pH=7,4). -----	68
Abbildung 35: Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode (a) in sauerstofffreiem bzw. (b) in CO-gesättigtem Phosphatpuffer mit 100 mM KCl (pH=7,4) bei 500 mV/s. -----	69
Abbildung 36: Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode in sauerstofffreiem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl bei (a) pH=4,5 (b) pH=7,4 und (c) pH=8,5. -----	69
Abbildung 37: Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode (a) in sauerstofffreiem bzw. (b) in sauerstoffhaltigem 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM KCl. Scanrate: 100 mV/s. -----	70
Abbildung 38: Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode (a) in sauerstofffreiem Puffer und in sauerstoffhaltigem Puffer: (b) ohne Verapamil, (c) mit 0,87 mM Verapamil, (d) mit 2,48 mM Verapamil, und (e) mit 3,21 mM Verapamil. Scanrate: 10 mV/s. -----	70
Abbildung 39: Strom-Zeit-Kurve einer bei -450 mV polarisierten Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode beim Einspritzen von 5 ml Sauerstoff in die Meßzelle. -----	71
Abbildung 40: Strom-Zeit-Kurve einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode bei -450 mV unter sukzessiver portionsweiser Zugabe von Verapamil (400 µl 20 mM). Die Endkonzentration in der Lösung erhöhte sich bei jeder Zugabe um 400 µM. -----	71
Abbildung 41: Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Metabolitenbildung für Verapamil bei der Elektrolyse mit einer CYP3A4-Elektrode. Bedingungen der Elektrolyse: Angelegtes Potential: -500 mV; Konzentration von Verapamil: 500 µM; pH-Wert der Meßlösung: 7,4. -----	74

- Abbildung 42: Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode (a) in sauerstoffreier und (b) in sauerstoffhaltiger Lösung ohne Midazolam, (c) mit 200  $\mu\text{M}$  Midazolam, (d) mit 800  $\mu\text{M}$  Midazolam, und (e) mit 1,5 mM Midazolam. Die Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen in der Meßlösung. ----- 77
- Abbildung 43: Strom-Zeit-Kurve einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode bei  $-450\text{ mV}$  unter sukzessiver Zugabe von Midazolam (200  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$ , 800  $\mu\text{M}$ , 1 mM und 1,5 mM). Die Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen in der Meßlösung.----- 78
- Abbildung 44: Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Metabolitenbildung für Midazolam bei der Elektrolyse mit einer CYP3A4-Elektrode. ----- 79
- Abbildung 45: Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode (a) in sauerstoffreier und (b) in sauerstoffhaltiger Lösung ohne Progesteron, (c) mit 200  $\mu\text{M}$  Progesteron, (d) mit 300  $\mu\text{M}$  Progesteron, und (e) mit 800  $\mu\text{M}$  Progesteron. Die Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen in der Meßlösung. ----- 80
- Abbildung 46: Strom-Zeit-Kurve einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode bei  $-450\text{ mV}$  unter sukzessiver Zugabe von Progesteron (50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  und 800  $\mu\text{M}$ ). Die Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen in der Meßlösung.----- 80
- Abbildung 47: Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode (a) in sauerstoffreier und (b) in sauerstoffhaltiger Lösung ohne Chinidin, (c) mit 50  $\mu\text{M}$  Chinidin, (d) mit 200  $\mu\text{M}$  Chinidin, und (e) mit 750  $\mu\text{M}$  Chinidin. Die Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen in der Meßlösung. ----- 81
- Abbildung 48: Strom-Zeit-Kurve einer Au-MPS-PDDA-CYP3A4-Elektrode bei  $-450\text{ mV}$  unter sukzessiver Zugabe von Chinidin (100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$  und 1 mM). Die Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen in der Meßlösung. - 81
- Abbildung 49: Auftragung der mittels Amperometrie gemessenen Reduktionsströme unter sukzessiver Zugabe von Verapamil gegen die Verapamilkonzentrationen. ----- 82
- Abbildung 50: Lineare Auftragung der Umsatzrate in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. (v) entspricht hier den mittels Amperometrie gemessenen Reduktionsströmen unter sukzessiver Zugabe von Midazolam (links). Hanes-Plot: Abhängigkeit des Reduktionsstromes von der Midazolamkonzentration (rechts). ----- 82
- Abbildung 51: Lineare Auftragung der Umsatzrate in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. (v) entspricht hier den mittels Amperometrie gemessenen Reduktionsströmen unter sukzessiver Zugabe von Progesteron (links). Hanes-Plot: Abhängigkeit des Reduktionsstromes von der Progesteronkonzentration (rechts). ----- 83
- Abbildung 52: Lineare Auftragung der Umsatzrate in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. (v) entspricht hier den mittels Amperometrie gemessenen Reduktionsströmen unter sukzessiver Zugabe von Chinidin (links). Hanes-Plot: Abhängigkeit des Reduktionsstromes von der Chinidinkonzentration (rechts).----- 83
- Abbildung 53: Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP2D6-Elektrode bei verschiedenen Scangeschwindigkeiten (100 mV/s, 200 mV/s, 300mV/s, 400 mV/s und 500 mV/s ) in Phosphatpuffer/KCl (pH = 7,4). ----- 85
- Abbildung 54: Die mit Au-MPS-PDDA-PSS-CYP2D6-Elektrode gemessenen Redox-Ströme in Abhängigkeit von der Wurzel der Scangeschwindigkeiten. ----- 85
- Abbildung 55: SQW-Voltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP2D6-Elektrode bei verschiedenen Frequenzen (100 Hz, 200 Hz und 600 Hz) in Phosphatpuffer/KCl (pH=7,4).----- 86

- Abbildung 56: Cyclovoltammogramme einer Au-MPS-PDDA-CYP2D6-Elektrode (a) in sauerstoffreier und (b) in sauerstoffhaltiger Lösung ohne Dextromethorphan, (c) mit 10  $\mu\text{M}$  Dextromethorphan, (d) mit 40  $\mu\text{M}$  Dextromethorphan und (e) mit 100  $\mu\text{M}$  Dextromethorphan. Die Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen in der Meßlösung.----- 87
- Abbildung 57: Strom-Zeit-Kurve einer Au-MPS-PDDA-PSS-CYP2D6-Elektrode bei  $-450\text{ mV}$  unter sukzessiver Zugabe von Dextromethorphan (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 70  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 120  $\mu\text{M}$  und 140  $\mu\text{M}$ ). Die Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen in der Meßlösung. ----- 87
- Abbildung 58: Lineare Auftragung der Umsatzrate in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. (v) entspricht hier den mittels Amperometrie gemessenen Reduktionsströmen unter sukzessiver Zugabe von Dextromethorphan (links). Hanes-Plot: Abhängigkeit des Reduktionsstromes von der Dextromethorphankonzentration (rechts). ----- 88

## **9 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Beispiel für Reaktionen verschiedener Substrate mit Cytochrom P-450. -----	5
Tabelle 2: Substrate und spezifische Reaktionen von CYP3A4 -----	11
Tabelle 3: Substrate und spezifische Reaktionen von CYP2D6 -----	13
Tabelle 4: Übersicht der gängigsten Immobilisierungsverfahren. -----	18
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Bezugsquellen -----	19
Tabelle 6: Die diagnostischen Parameter für reversible, irreversible und quasi-reversible Reaktionen. Die Abkürzungen sind im Text erläutert. -----	34
Tabelle 7: Elektrochemisches Verhalten der verwendeten Reagenzien im gewählten Potentialfenster. -----	49
Tabelle 8: Elektrochemische Parameter der verwendeten Mediatoren auf der blanker GC- Elektrode. -----	50
Tabelle 9: Elektrochemische Parameter der verwendeten Mediatoren auf der GC-BSA-GA- CYP3A4–Elektrode im anaeroben Medium. -----	50
Tabelle 10: Elektrochemische Parameter der verwendeten Mediatoren auf der GC-BSA-GA- CYP3A4 –Elektrode im aeroben Medium. -----	51
Tabelle 11: Elektrochemische Parameter der verwendeten Mediatoren auf der PG-DDAB- CYP3A4–Elektrode im anaeroben Medium. -----	51
Tabelle 12: Elektrochemische Parameter der verwendeten Mediatoren auf der PG-DDAB- CYP3A4–Elektrode im aeroben Medium. -----	51
Tabelle 13: Elektrochemische Parameter der Pt-Polymer-CYP3A4–Elektrode im aneroben Medium. -----	52
Tabelle 14: Elektrochemische Parameter der Pt-Polymer-CYP3A4–Elektrode im aeroben Medium. -----	52
Tabelle 15: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen über die katalytischen Fähigkeiten der Mediator-Enzym-Systeme. -----	53
Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen über die katalytischen Fähigkeiten der Mediator (Polymer)-Enzym-Systeme. -----	54
Tabelle 17: Zusammenfassung der Ergebnisse der Cyclovoltammetrie für verschieden modifizierte CYP3A4-PG-Elektroden. -----	55
Tabelle 18: Zusammenfassung der Ergebnisse der Cyclovoltammetrie für verschieden modifizierte CYP3A4-GC-Elektroden. -----	57
Tabelle 19: Zusammenfassung der Ergebnisse der Cyclovoltammetrie für verschieden modifizierte CYP3A4-ITO-Elektroden. -----	59
Tabelle 20: Zusammenfassung der Ergebnisse der Cyclovoltammetrie für verschieden modifizierte CYP3A4-Pt-Elektroden. -----	60
Tabelle 21: Zusammenfassung der Ergebnisse der Cyclovoltammetrie für verschieden modifizierte CYP3A4-Au-Elektroden. -----	61
Tabelle 22: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen der katalytischen Eigenschaften für elektroaktive Enzymelektroden. -----	63
Tabelle 23: Redoxpotentiale für CYP3A4 bei verschiedene Scangeschwindigkeiten. -----	67
Tabelle 24: Reduktionspotentiale in Abhängigkeit ausgewählter Frequenzen. -----	68
Tabelle 25: Die Ergebnisse der Produktanalysen der unter verschiedenen Bedingungen durchgeführten Elektrolysen. Die angelegte Spannung betrug –500 mV; Konzentration von Verapamil: 500 µM-----	72

Tabelle 26: Umsatzraten der Hauptmetabolite des Verapamils bei verschiedenen Elektrolysen. Die Elektrolysen wurden mit verschiedenen, gleich präparierten CYP3A4-Elektroden durchgeführt.-----	73
Tabelle 27: Ergebnisse des zeitlichen Verlaufs der Metabolitenbildung. -----	73
Tabelle 28: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Einflusses von Ketoconazol auf die CYP3A4-vermittelte Metabolitenbildung von Verapamil. Für beide Elektrolysen (40 Minuten und 60 Minuten) wurden verschiedene, gleich präparierte CYP3A4-Elektroden verwendet. -----	74
Tabelle 29: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Einflusses von Superoxid auf die CYP3A4-vermittelte Metabolitenbildung von Verapamil. Für beide Elektrolysen (40 Minuten und 60 Minuten) wurden verschiedene, gleich präparierte CYP3A4-Elektroden verwendet.-----	75
Tabelle 30: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Einflusses von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf die CYP3A4-vermittelte Metabolitenbildung von Verapamil. Für beide Elektrolysen (40 Minuten und 60 Minuten) wurden verschiedene, gleich präparierte CYP3A4-Elektroden verwendet.-----	76
Tabelle 31: Die Ergebnisse (Mittelwerte zweier Versuche) bzgl. des Sauerstoffverbrauchs bzw. der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung bei unter verschiedenen Bedingungen durchgeführten Elektrolysen (Elektrolysedauer: 1 Stunde).-----	77
Tabelle 32: Die Ergebnisse der Produktanalysen bei unter verschiedenen Bedingungen durchgeführten Elektrolysen. -----	79
Tabelle 33: Schätzwerte der kinetischen Parameter der untersuchten Substrate des CYP3A4 mit den zugehörigen Standardfehlern. -----	84
Tabelle 34: Redoxpotentiale für CYP2D6 bei verschiedenen Scangeschwindigkeiten.-----	84
Tabelle 35: SQW-Voltammogramme einer Au-MPS-PDDA-PSS-CYP2D6-Elektrode bei verschiedenen Frequenzen (100 Hz, 200 Hz und 300 Hz) in Phosphatpuffer mit 100 mM KCl (pH=7,4).-----	86

## Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bedanken:

Bei Prof. Dr. Uwe Fuhr nicht nur für die Überlassung des interessanten Themas, seine konstruktive Kritik, die Förderung meiner selbständigen Arbeit, sondern vor allem für das freundschaftliche Verhältnis sowie für seine bösen Sprüche und sein liebes Wesen.

Bei Prof. Dr. Reinhard Krämer für seine Bereitschaft die Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen und für viele fruchtbare Diskussionen.

Bei Prof. Dr. Gerd Meyer für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Bei Köln-Fortune für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. James Rusling für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und seinen fachlichen Rat.

Bei Priv. Doz. Dr. Thomas Link für die Hilfe bei der Durchführung der spektroelektrochemischen Messungen.

Bei Priv. Doz. Dr. Thomas Friedberg für die freundliche Überlassung der P-450-Enzyme.

Bei Dr. Yuri Lvov für die vielen praktischen Ratschläge und die Einführung in die QCM-Technik.

Bei Dr. Dieter Lang von der Bayer AG, Abt. Metabolismus und Isotopen Chemie sowie Dr. Ute Hofmann und Dr. Oliver von Richter vom Dr. Margarete-Bosch-Institut für die LC-MS-Analytik.

Bei Trevor Saccucci für seine Gastfreundschaft und besonders für den morgendlichen Kaffee während meines Aufenthaltes in Connecticut sowie allen Kollegen des dortigen Arbeitskreises für die Herzlichkeit, die sie mir entgegengebracht haben.

Bei allen meinen Kollegen für das angenehme und offene Arbeitsklima.

Bei Hendrik, Sarah, Stephan und Wolfgang für das Korrekturlesen.

Bei meinen Schwiegereltern, Stefan, Frank, Bigi, Thomas, Melisa und meiner Schwester Shiji, die nach mißlungenen Versuchen immer für gute Laune gesorgt haben.

Bei meinen Geschwistern, die wenn auch aus der Ferne, immer für mich da waren.

Bei meinem Mann, der mit seiner unerschöpflichen Geduld und seinem Humor, mich immer motiviert hat.

Vor allem möchte ich meinen Eltern, die mich immer begleiten werden, für alles danken.

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Reinhard Krämer betreut worden.

#### **Teilpublikationen:**

1. Joseph S, Rusling RF, Friedberg T, Lvov Y and Fuhr U (1999).  
Immobilization of human cytochrome P-450 CYP3A4 on a gold electrode for the development of a biosensor.  
Eur. J. Clin. Pharmacol., 55 (3), A7.
2. Joseph S, Lvov YM, Rusling RF, Friedberg T and Fuhr U (1999).  
Use of self assembled human CYP3A4 films as biosensors.  
11<sup>th</sup> International Conference on Cytochrome P-450, Aug. 29-Sep. 2, Sendai, P-030.
3. Joseph S, Lvov YM, Rusling RF, Friedberg T and Fuhr U (1999).  
Electrochemical sensor with drug metabolizing enzyme.  
196<sup>th</sup> Meeting of The Electrochemical Society, Okt. 17-22, Hawaii, A-2024.
4. Joseph S, Lvov YM, Rusling RF, Friedberg T and Fuhr U.  
An amperometric biosensor with immobilized human cytochrome P-450 CYP3A4 as a novel tool for enzyme characterization.  
In Vorbereitung.



## **Lebenslauf**

**Name** Shiba Joseph  
**Geburtsdatum/-ort** 31.07.1967 in Kainady, Indien  
**Nationalität** indisch  
**Religion** römisch-katholisch  
**Familienstand** verheiratet mit Thomas Roesberg  
**Eltern** Mathew und Selin Joseph (geb. Allapatt)

### ***Bildungsweg***

1972-1976 St. Marys Primary School, Kainady  
1976-1982 A. J. John Memorial HS, Kottayam  
1982-1984 Voruniversitätskurs am BCM College, Kottayam  
1984-1987 Studium der Physik, Chemie und Mathematik am BCM College, Kottayam mit dem Abschluß "Bachelor of Science"  
1988-1989 Deutschkurs an der Universität zu Köln  
WS 1989/1990 Beginn des Physikstudiums an der Universität zu Köln  
SS 1990 Wechsel zum Chemiestudium an der Universität zu Köln  
SS 1996 Diplom-Chemiker-Hauptprüfung  
9/1996-7/1997 Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie, Universität zu Köln  
9/1997 Promotion an der Universität zu Köln mit dem Thema „Entwicklung eines amperometrischen Biosensors mit Cytochrom P-450-Enzymen des Menschen“ unter Leitung von Prof. Dr. R. Krämer, Institut für Biochemie, Köln

### ***Auslandsaufenthalte***

1/1997 Mitarbeit im Department of Chemistry, Biosensor Division, Dublin City University, Ireland  
10/1998-1/1999 Guest research scholar, Department of Chemistry, Connecticut University, CT

### ***Berufliche Tätigkeit***

Ab 9/1997 Wissenschaftliche Hilfskraft/Mitarbeiterin am Institut für Pharmakologie, Köln