

# Untersuchungen zur Anbindung von Proteinen und Peptiden an Biomaterialien sowie zur Schädigung dieser Proteine und Peptide durch Reaktive Sauerstoff Spezies

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Chemiker  
Lars Nothdurft  
aus Stuttgart

Berichter:     Universitätsprofessor Dr. Gerhard Buse  
                  Universitätsprofessor Dr. Hartwig Höcker

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2001



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	BIOMATERIALIEN .....	2
1.1.1	Werkstoffe .....	2
1.1.2	Bioaktive Oberflächen .....	9
1.2	BIOMATERIALIEN IN DIREKTEM GEWEBEKONTAKT .....	11
1.2.1	Gewebe und Gewebeorganisation .....	11
1.2.1.1	Bindegewebe, Stützgewebe und Blut.....	12
1.2.1.2	Gewebeorganisation.....	15
1.2.2	Entzündungsreaktionen.....	17
1.3	ENTZÜNDUNGSINDUZIERTER MODIFIKATIONEN AN PROTEINEN .....	20
1.3.1	Vorkommen und Reaktionen von Radikalen im Organismus .....	20
1.3.2	Einwirken reaktiver Spezies auf Proteine .....	28
1.3.2.1	Reaktionen des Hydroxylradikals .....	29
1.3.2.2	Reaktionen der Hypochlorigen Säure .....	32
1.3.2.3	Reaktionen der Peroxosalpetrigen Säure.....	33
1.4	AUFGABENSTELLUNG.....	34
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>36</b>
2.1	MATERIALIEN FÜR DEN HARTGEWEBEKONTAKT.....	36
2.1.1	Einführen von Aminogruppen auf Festkörperoberflächen.....	36
2.1.2	Anbindung von Proteinen an mit Aminogruppen funktionalisierte Festkörperoberflächen.....	37
2.2	MATERIALIEN FÜR DEN WEICHGEWEBEKONTAKT.....	38
2.2.1	Anbindung von Proteinen an mit Carboxylgruppen funktionalisierte Festkörperoberflächen .....	40
2.3	MEERRETTICH-PEROXIDASE ALS MODELLPROTEIN.....	41
2.4	IN VITRO-RADIKALSYSTEME .....	42
2.4.1	Fenton-System.....	42
2.4.2	Hypochlorige Säure (HOCl) .....	42
2.4.3	Peroxosalpetrige Säure (HOONO) .....	42
2.5	PROTEIN-NITRIERUNG.....	43
2.6	ANALYTIK.....	44
2.6.1	Bestimmung der Zahl der Amino-Gruppen auf Festkörperoberflächen.....	44
2.6.1.1	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) .....	44
2.6.1.2	s-Succinimidyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat (sSDBT).....	45
2.6.2	Aminosäureanalyse von an PDLLA-AAc gebundenen Proteinen und Peptiden .....	46
2.6.3	Photometrische Bestimmung der Menge gebundener Meerrettichperoxidase.....	46
2.6.4	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR).....	47
2.6.5	Carbonylierungs-Experimente .....	48
2.6.6	Photometrische Bestimmung von 3-Nitrotyrosin-Gruppen in Proteinen .....	50
2.6.7	Flüssigkeitschromatographie.....	50

2.6.8	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie - HPLC .....	51
2.6.9	Immunologische Nachweismethoden – ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay).....	52
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
3.1	IMMOBILISIERUNG VON PROTEINEN AN MATERIALIEN FÜR DEN HARTGEWEBEKONTAKT .....	54
3.1.1	Bestimmung der Anzahl eingeführter Aminogruppen .....	55
3.1.1.1	TiAl6V4 als Substrat.....	55
3.1.1.2	Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> als Substrat .....	57
3.1.2	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Aminofunktionalisierung.....	58
3.1.3	Anbindung von Proteinen an aminofunktionalisierte Festkörperoberflächen.....	59
3.1.3.1	Bindung von HRP an aminofunktionalisiertes und mittels GDA aktiviertes Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> .....	60
3.1.3.2	Bindung von HRP an aminofunktionalisiertes und mittels GDA aktiviertes TiAl6V4 .....	61
3.2	IMMOBILISIERUNG VON PROTEINEN AN MATERIALIEN FÜR DEN WEICHGEWEBEKONTAKT .....	64
3.3	IN-VITRO ERZEUGUNG REAKTIVER SAUERSTOFF- UND STICKSTOFFSPEZIES ZUR MODIFIZIERUNG VON AMINOSÄUREN UND PROTEINEN .....	74
3.3.1	Hypochlorige Säure.....	75
3.3.2	Peroxosalpetrige Säure.....	77
3.3.3	Hydroxyl-Radikale .....	78
3.3.3.1	Indirekter Nachweis der Hydroxylradikale mittels DNPH-Test.....	78
3.3.3.2	Direkter Nachweis der Hydroxylradikale mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR).....	81
3.4	NACHWEIS ENTZÜNDUNGSBEDINGTER VERÄNDERUNGEN AN PROTEINEN .....	83
3.4.1	Qualitativer Nachweis von 3-Nitrotyrosin .....	84
3.4.2	Quantitativer Nachweis von 3-Nitrotyrosin .....	85
3.4.3	ELISA zur Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in Proteinen .....	91
<b>4</b>	<b>Diskussion und Ausblick.....</b>	<b>96</b>
4.1	IMMOBILISIERUNG VON PROTEINEN AN MATERIALIEN FÜR DEN HARTGEWEBEKONTAKT .....	96
4.2	IMMOBILISIERUNG VON PROTEINEN AN MATERIALIEN FÜR DEN WEICHGEWEBEKONTAKT .....	98
4.3	NACHWEIS RADIKALINDUZierter MODIFIZIERUNGEN .....	100
4.3.1	Carbonylierung .....	101
4.3.2	3-Nitrotyrosin.....	102
4.3.2.1	Photometrische Bestimmung.....	103
4.3.2.2	Bestimmung mittels HPLC.....	104
4.3.2.3	Bestimmung mittels ELISA .....	105
4.3.3	Konsequenzen der Nitrierung: Signalwege, Proteasom und Redoxstatus.....	107
4.4	AUSBLICK.....	108
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>131</b>

## Abkürzungsverzeichnis

APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
BSA	Rinderserumalbumin
DABS-Cl	4-Dimethylaminoazobenzol-4'-sulfonylchlorid <u>25</u>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazon <u>24</u>
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Hydrat <u>21</u>
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
ELISA	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
ESR	Elektronenresonanz-Spektroskopie
GDA	Glutaraldehyd
Gl.	Gleichung
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
Mr	relative Molekülmasse
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PBN	N-tert.-Butyl- $\alpha$ -Phenylnitron
PBS	Phosphate Buffered Saline (physiologischer Phosphat-Puffer)
PDLLA	Poly(D,L)Milchsäure
PDLLA-AAc	mit Polyacrylsäure gepfropfte Poly(D,L)Milchsäure
PEEK	Polyetheretherketon <u>1</u>
PHEMA	Hydroxyethylmethacrylat <u>3</u>
PMMA	Polymethylmethacrylat <u>2</u>
PMNs	Neutrophile Granulozyten (Polymorphonuclear Neutrophils)
PTFE	PolyTetrafluorethylen
R.	Reaktion
RGD	zelladhäsionsförderndes Peptid mit der Sequenz Arg-Gly-Asp
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Raumtemperatur
RWTH	Rheinisch Westfälische Technische Hochschule Aachen
SDS	Natriumdodecylsulfat
sSDTB	s-Succinimidyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat <u>27</u>
TFA	Trifluoressigsäure
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure <u>26</u>
ÜN	über Nacht
UV/VIS	Ultraviolette/Sichtbares Licht



# 1 Einleitung

Schon lange werden Defekte und Defizite des menschlichen Körpers mit Hilfe ganz unterschiedlicher Materialien ausgeglichen, die zur Herstellung von Prothesen der äußeren Extremitäten, Zahnersatz oder optischen Gläsern zur Korrektur einer Fehlsichtigkeit eingesetzt werden (Nerlich et al., 2000). Neben Holz und Leder werden dazu Knochen und Keramik, später auch Glas und Metall verwendet, wobei sich das Einsatzspektrum parallel zur Entwicklung neuer Materialien und verbesserter Bearbeitungsmethoden erweitert. Für Defekte des Stützapparates, die einen Einsatz dieser Hilfsmittel im Körper erfordern, werden bevorzugt Metalle verwendet, allerdings ermöglicht erst die Verfügbarkeit rostfreier Stähle einen verstärkten Einsatz. Ganz neue Möglichkeiten eröffnet schließlich die Entdeckung und rasch vorangetriebene Entwicklung der Polymere.

Fortschritte in der Produktion und der Verarbeitung der Werkstoffe sowie die Weiterentwicklung der Materialeigenschaften führen zu Verbesserungen der daraus hergestellten Produkte. Erst relativ spät wird gezielte Forschung betrieben, die integrativ neben dem Werkstoff und dem Werkstück auch dessen Einsatz im Körper berücksichtigt. Die nun einsetzende stürmische Entwicklung führt zur Etablierung eines interdisziplinären Forschungsgebietes, das sowohl Mediziner und Ingenieure als auch Naturwissenschaftler beschäftigt, der Biomaterialforschung. Bisheriger Höhepunkt dieser Entwicklung ist das "Tissue Engineering", das versucht, komplette Gewebe bis hin zu ganzen Organen zu ersetzen (Hanisch, 2000).

Die im Zusammenhang mit Biomaterialien auftretenden Schwierigkeiten betreffen hauptsächlich die Reaktionen der unterschiedlichen Körpergewebe auf einen Fremdkörper. Das Ausmaß dieser Reaktionen hängt dabei entscheidend von den Oberflächeneigenschaften des Werkstückes ab, so daß deren Modifizierung oft sinnvoll ist.

In der vorliegenden Arbeit spielt die Wechselwirkung zwischen Molekülspezies, die bei durch Biomaterialien ausgelösten entzündlichen Reaktionen auftreten, und modifizierten Festkörperoberflächen eine wichtige Rolle. Daher soll im Folgenden ein Überblick über Werkstoffe in der Biomaterialanwendung, die Charakteristika der verschiedenen Gewebetypen sowie das Zustandekommen von Entzündungsreaktionen gegeben werden.

## **1.1 Biomaterialien**

### **1.1.1 Werkstoffe**

Neben der mechanischen und technischen Funktionserfüllung müssen die Werkstoffe und Werkstücke auch gewebeverträglich sein. Es zeigt sich schnell, daß nicht alle Materialien für einen Kontakt mit Körpergewebe geeignet sind, da sie schwere Entzündungen, eine Sepsis oder Allergien auslösen. Ihre toxische, antigene oder allergene Wirkung verbietet ihren Einsatz im und manchmal auch am Körper, sie sind bio-inkompatibel. Können die Werkstoffe und Werkstücke steril gehalten werden und lösen sie keine schweren Allergien und Entzündungen aus, so können sie als biokompatibel betrachtet werden, wobei auch die Dauer des Gewebekontaktes berücksichtigt werden muß.

Biokompatibilität kann als Verträglichkeit zwischen technischen und biologischen Systemen verstanden werden, und umfaßt auf der Werkstoffseite neben den Eigenschaften des Festkörpers und dessen Formgebung auch die Physik, Chemie und Topographie der Oberfläche. Gegenüber dem biologischen System verhält sich das biokompatible technische System dabei entweder bio-inert oder aber bio-aktiv. Biokompatibel heißt im Idealfall also, daß keine unerwünschte Wechselwirkung zwischen Biomaterial und angrenzendem Gewebe erfolgt, wobei entweder keine Wechselwirkung (bioinert) oder aber eine erwünschte Wechselwirkung (bioaktiv) beobachtet werden kann.

Bei den aus biokompatiblen Materialien (Biomaterialien) hergestellten Produkten handelt es sich um Medizinprodukte, zu denen Gelenkprothesen, Knochenzement, Nähfäden und chirurgische Instrumente, aber auch Einmalartikel (Spritzen, Kanülen, Katheter, Drainagen), Verbandstoffe und Hygieneartikel zu zählen sind (Planck, 1993). Eine Prothese ist ein aus unbelebtem Material hergestelltes Hilfsmittel, das einen materiellen und funktionellen Ersatz für Defektstrukturen liefert, wobei zwischen extra- und intrakorporalen Prothesen unterschieden werden muß. Als Implantat ist jedes zum Funktionsersatz künstlich in den Körper eingebrachte Material zu betrachten. Eine Endoprothese ist also auch ein Implantat, ein Herzschrittmacher hingegen, der nur einen funktionellen Ersatz darstellt, wird nicht als Prothese betrachtet (Wintermantel und Ha, 1998). Wird auch die Belegung von inneren und äußeren Körperoberflächen berücksichtigt, so umschreibt der Begriff Implantat neben



Gelenk- oder Gefäßprothesen auch Kontrazeptiva oder Kontaktlinsen. Je nach Verweildauer unterscheidet man Temporär- und Langzeit-Implantate.

Die Palette der biokompatiblen Werkstoffe reicht von Metallen und Metallegierungen über Gläser, Glaskeramiken und Keramiken bis hin zu den Polymeren und Verbundwerkstoffen, die einzeln oder in Kombination, als Werkstoff oder als Werkstück eingesetzt werden. Für ihren Einsatz als Biomaterial ist neben der chemischen Zusammensetzung, den Oberflächeneigenschaften (Energie, Hydrophilie, Porosität, Topographie), dem Herstellungsprozeß und der Verarbeitung auch die Formgebung von Bedeutung.

### *Metalle und Metallegierungen*

Metalle und Legierungen werden vorwiegend für Gelenkprothesen und Fixationselemente (Osteosyntheseplatten, Marknägeln, Schrauben) verwendet. Für diesen Verwendungszweck spielen besonders die mechanische Festigkeit (der E-Modul) und die Korrosionsbeständigkeit eine wichtige Rolle, die weitgehend vom Metallgefüge abhängen. Durch Korrosion wird die Oberfläche des Werkstückes verändert, die dabei freiwerdenden Ionen wirken je nach Toxizität und Löslichkeit auf die Gewebe ein. Neben Chrom-Nickel-Stählen kommen vor allem Kobalt-Chrom-Legierungen, Titanlegierungen (TiAl6V4, TiAl6Nb7)<sup>1</sup> und 'commercially pure' (cp) Titan zum Einsatz. Durch ihre mechanischen Eigenschaften sind die metallischen Werkstoffe gut zur Lastübertragung geeignet und werden deshalb hauptsächlich dort eingesetzt, wo große Kräfte aufgenommen werden müssen, an den Gelenken und Knochen - sie werden deshalb auch zu den Hartgewebe-Implantaten gerechnet. Die weicheren Edelmetalle finden vor allem in der Dentalchirurgie Verwendung.

Titan sowie die Titanlegierungen sind aufgrund ihrer passivierenden Oxidschicht (Rutilstruktur TiO<sub>2</sub>; Browne und Gregson, 1994) besonders korrosionsarm (Korrosionsrate für cpTitan etwa 30 µg/cm<sup>2</sup> pro Jahr; Williams, 1981). Die durchschnittliche Oxidschichtdicke beträgt für das Metall etwa 32 Å, für die Legierungen etwa 83 Å<sup>2</sup> (Keller et al., 1994).

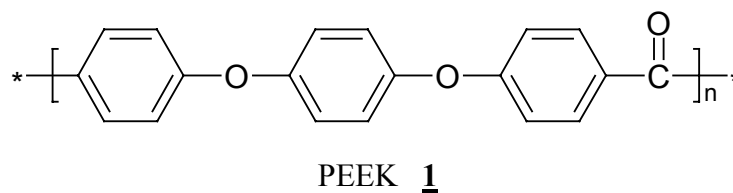
---

<sup>1</sup> Die Verwendung von Niob anstelle von Vanadium ergibt sich aus Untersuchungen die gezeigt haben, daß die löslichen Vanadiumverbindungen toxischer als die des Niob sind (Semlitsch et al., 1991).

<sup>2</sup> In verschiedenen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, daß unterschiedliche Oxidschichtdicken keinen Einfluß auf die Zelladhäsion und Zellmorphologie haben (Williams, 1981).

Titan besitzt gegenüber rostfreiem Stahl eine geringere Steifigkeit (kleinerer E-Modul; Hille, 1966) und somit ein geringeres 'stress shielding' bei größerer Dauerfestigkeit.<sup>3</sup>

Gegenüber den isotropen Metallgefügen können Hartgewebeimplantate aus Faserverbundwerkstoffen anisotrop hergestellt werden. Da Knochen ebenfalls anisotrop ist, führt die dadurch erzielte Annäherung des elastischen Verformungsverhaltens zu einer Minimierung der Dehnungsdifferenz und somit zur Strukturkompatibilität. Die Werkstoffe bestehen oft aus Kohlenstoff-Fasern, die in eine thermoplastische Matrix aus Polysulfon, Polyamid oder Polyetheretherketon (PEEK 1) eingebettet sind.



### *Keramiken und Gläser*

Die wichtigsten keramischen Werkstoffe sind Aluminiumoxid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) und Zirkonoxid ( $\text{ZrO}_2$ ), die beide z.B. als Hüftgelenkkugel eingesetzt werden. Daneben werden Calciumphosphate und Gläser/Glaskeramiken als bioaktiver Knochenersatz (Füllmaterial für Knochendefekte) verwendet. Bioaktiv bedeutet hier, daß Knochen besonders rasch und fest an diese Materialien anwächst, weshalb beispielsweise die Schäfte von Hüftprothesen mit Hydroxylapatit ( $\text{HA}$ ,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) beschichtet werden (Gomez-Vega et al., 2000). Neben der ständigen Weiterentwicklung dieser Werkstoffe werden auch neuere, in der Technik bereits bewährte Materialien, beispielsweise die Nichtoxidkeramik Siliziumnitrid ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ; Lange et al., 1991), auf Ihre Eignung als Biomaterial hin untersucht (Sohrabi et al., 2000).

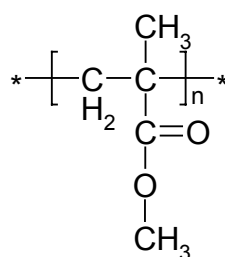
### *Polymere*

Polymere weisen eine große Einsatzbreite auf. Sie werden als massives Werkstück, als Folie oder als Faser (Garn, Vlies, Gestrick) verwendet und eignen sich für die Herstellung von Weichgewebe-Implantaten, finden aber auch zur Herstellung von Einwegartikeln, in der Diagnostik (Polystyrol, PS) oder zur gezielten Freisetzung von Pharmaka (drug delivery) Verwendung.

---

<sup>3</sup> Trotz der günstigen Materialeigenschaften ergeben sich mitunter Schwierigkeiten beim praktischen Einsatz (Balzli, 2000).

Zu den aus Polymeren hergestellten Implantaten zählen Gefäßprothesen, Herzklappen, Nahtmaterial, Sehnen- und Bänderersatz, Knochenzement, Intraokular-Linsen, Blasenprothesen (Hubbell, 1999; Oberpenning et al., 1999) und Brustimplantate sowie Werkstücke aus Faserverbundwerkstoffen, deren Matrixwerkstoff sie stellen. Dazu kommen Hautersatz, Kontaktlinsen, Katheter, Dialysemembranen, Oxygenatoren und Dialysatoren, Dialyse- und Transfusionsschläuche, Infusionsbestecke und weitere Kanülen, Wundverbände, Spritzen, Untersuchungshandschuhe sowie Verpackungsmaterial. Zu den wichtigsten synthetischen Polymeren im medizinischen Einsatz gehören neben Polyvinylchlorid (PVC) (Lantos, 1988) und Polyethylen (PE) die Polycarbonate (PC), Polyurethane (PUR), Polysiloxane sowie Polytetrafluorethylen (PTFE), Polysulfon (PSU) und Polymethylmethacrylat (PMMA 2) (Hull, 1995). Daneben kommen auch 'natürliche' Polymere zum Einsatz, die wichtigsten darunter sind Kollagen, Chitosan oder Fibrin.

PMMA 2

Außer den Werkstoffeigenschaften spielen gerade bei den Polymeren auch die Herstellung, Verarbeitung, Formung, Lagerung und Sterilisierbarkeit eine Rolle. Durch die vielfältigen Einsatzbereiche ist für zahlreiche Anwendungen neben der allgemeinen Biokompatibilität und Funktionalität besonders die Hämkompatibilität der Werkstoffe wichtig (Lahann et al., 1999). Zu den hämkompatiblen Werkstoffen zählt PVC, das als Weich-PVC<sup>4</sup> extrakorporal für Blutbeutel oder Schläuche verwendet wird. Intrakorporale Gefäßimplantate werden aus PUR oder PTFE gefertigt. Die ebenfalls als hämkompatibel geltenden Polysiloxane werden vorwiegend als Elastomere eingesetzt und benötigen keine Weichmacher, müssen allerdings über Füllstoffe (z.B. SiO<sub>2</sub>) stabilisiert werden. Bekanntes Verwendungsbeispiel der Polysiloxane sind die umstrittenen Brustimplantate.

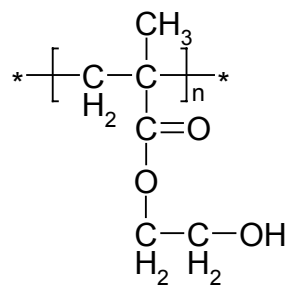
---

<sup>4</sup> Ein typischer Weichmacher ist beispielsweise Dioctylphthalat, DOP.

Die bereits genannten Faserverbundwerkstoffe, die in der Orthopädie zur Herstellung von anisotropen Hartgewebeimplantaten Verwendung finden, bestehen oft aus in eine PEEK-Matrix eingebetteten Kohlenstoff-Fasern.

Ebenfalls in der Orthopädie kommt Polyethylen (UHMWPE)<sup>5</sup> als Gelenkpfanne für Hüftgelenkprothesen oder PMMA als Knochenzement zum Einsatz. Daneben kann PMMA aber auch in der Ophthalmologie als Werkstoff für 'harte' Kontaktlinsen verwendet werden.

Ein Derivat des Methylmethacrylates, das Hydroxyethylmethacrylat mit einer endständigen Hydroxyl-Gruppe, ist als Polymer (HEMA 3) in der Lage, Hydrogele zu bilden und wird zur Herstellung von 'weichen' Kontaktlinsen verwendet. Unter einem Hydrogel versteht man ein dreidimensionales Polymernetzwerk, daß durch Quellen große Mengen Wasser binden kann, ohne sich dabei aufzulösen.



HEMA 3

Eine eigene Gruppe stellen die biodegradierbaren Polymere dar, die sich im Körper auflösen und so im Falle von Implantaten durch körpereigenes Gewebe ersetzt werden können. Durch die Verwendung degradierbarer Implantate entfällt die sonst zur Entfernung temporärer Implantate notwendige Nachoperation (Orthopädie, Parodontologie). Das Vermögen, sich aufzulösen, muß dabei als Spagat zwischen mechanischer Festigkeit und Degradationsgeschwindigkeit verstanden werden. Wichtige Faktoren, die die Auflösung beeinflussen sind die Kristallinität und das Molekulargewicht. Niedrigeres Molekulargewicht und geringe Kristallinität führen zu rasch degradierenden Werkstücken, höherkristalline Polymere sind dagegen für mechanische Stabilität wichtig. Eine Möglichkeit der

---

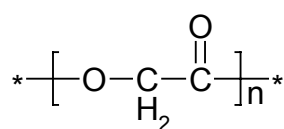
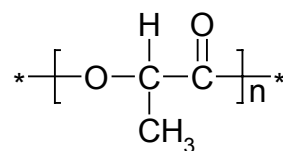
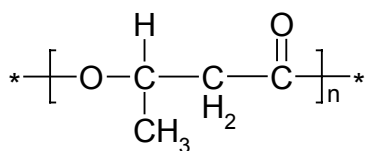
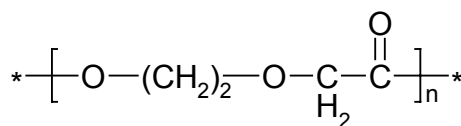
<sup>5</sup> An diesem Beispiel läßt sich zeigen, wie wichtig die Art der Herstellung ist: lediglich das Ultra High Molecular Weight Polyethylen (UHMWPE) verfügt über die gewünschten mechanischen Eigenschaften (Streicher et al., 1990; Willert et al., 1990).

Einflußnahme bietet die Verwendung von Co-Polymeren variabler Zusammensetzung (Kenley et al., 1987; Sawhney und Hubbell, 1990; Visscher et al., 1985).

Die Polymerdegradation erfolgt als unspezifische Hydrolyse, die als 'bulk degradation' im Unterschied zur enzymatischen 'surface degradation' unabhängig von der exponierten Fläche ist. Bei dieser Form der Degradation bleibt die relativ größere Oberfläche länger erhalten, so daß die Abbauprodukte im degradierten Festkörper nicht laufend abtransportiert werden können.<sup>6</sup> Die Biokompatibilität der degradierbaren Polymere muß sich auch auf die Abbauprodukte (Teilstücke, Monomere) erstrecken, die entweder metabolisch oder aber direkt renal ausgeschieden werden (Vert et al., 1992).

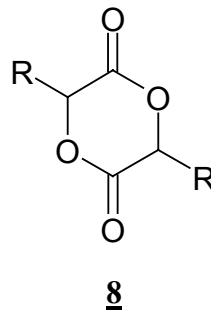
Degradierbare Polymere werden bisher als Nahtfäden, Membranen und Wundabdeckungen, Osteosynthesysteme, Zellträger (scaffold) und Arzneimittelfreisetzende-Systeme eingesetzt. Für die zuletzt genannte Anwendung, 'drug delivery', können die Pharmaka entweder in den Werkstoff eingebracht, auf den Werkstoff aufgebracht oder aber durch eine Werkstoff-Membran (microspheres) eingeschlossen werden. In dieser Reihenfolge spricht man von Matrix-, Träger- oder Membransystemen.

Aliphatische Esterverbindungen sind relativ hydrolyselabil und eignen sich deshalb gut als Werkstoff für degradierbare Polymere. Neben Polyglykolsäure (Poly(glykolid) – PGA 4) und Polymilchsäure (Poly(lactid) – PLA 5) sind dies vor allem Poly-(ε-caprolacton) (PCL), Poly-(γ-hydroxybutyrat) (PHB 6) und Poly-(p-dioxanon) (PDS 7).

PGA 4PLA 5PHB 6PDS 7

<sup>6</sup> Die bei der Auflösung von Poly-Milchsäure (PLA) freiwerdende Milchsäure erzeugt ein saures Milieu, das die weitere Degradation autokatalytisch beschleunigt (Göpferich, 1996; Li und McCarthy, 1999).

Die beiden bisher am häufigsten eingesetzten Polyester sind PLA und PGA sowie daraus hergestellte Co-Polymere variabler Zusammensetzung. Sowohl Polylactid als auch Polyglycolid werden durch ringöffnende Polymerisation in der Schmelze bei 140 - 180 °C mit einem Katalysator aus den Lactiden **8a** bzw. Glykoliden **8b** hergestellt (Drumright et al., 2000; Kissel et al., 1991).



a) R = -H Glykolid

b) R = -CH<sub>3</sub> Lactid

Polyglykolsäure degradiert relativ rasch und ist ebenso wie die racemische Mischform der amorphen D,L-Polymilchsäure mechanisch nicht besonders belastbar. Die teilkristalline, mechanisch stabilere L-Form der Polymilchsäure ist dagegen nur schlecht degradierbar, findet aber aufgrund ihrer Stabilität Anwendung in Osteosynthesystemen (Platten, Nägel) für Bereiche, die nur geringen Lasten ausgesetzt sind.

Die natürlichen Polymere Kollagen, Chitosan und Fibrin können ebenfalls im Körper abgebaut werden, allerdings spricht man in diesem Fall besser von Resorption als von Degradation. Der Begriff "natürlich" trifft noch am meisten auf Fibrin oder Fibrinogen zu und bezeichnet eher die Herkunft der Ausgangsmaterialien als die daraus resultierenden Werkstoffe. Fibrin wird aus Human-Blut gewonnen, wirkt hämostatisch und wird (zusammen mit Fibrinogen, Faktor XIII und Antifibrinolytika) als Gewebeklebstoff oder als Matrix-Werkstoff verwendet (Herbert et al., 1998). Kollagen wird durch Extraktion anderer Bestandteile aus Knochen, Haut und Sehnen gewonnen (fibrilläres Kollagen). Durch proteolytische Spaltung erhält man daraus lösliches Kollagen. Es gibt mindestens zwölf verschiedene Kollagen-Typen,<sup>7</sup> die fibrillär, fibrillen-assoziiert oder nicht-fibrillär sind. Kollagen ist als bioaktiver Werkstoff in der Lage, die Zellproliferation zu fördern und wird als Schaum, Gel oder Faser (Gestrick) zum Füllen von Gewebedefekten, als Wundabdeckung oder Blasenimplantat eingesetzt. Das Polysaccharid Chitosan schließlich (antimikrobiell,

---

<sup>7</sup> Eine Übersicht gibt (Darnell et al., 1994).

hämostatisch) entsteht durch Deacetylierung von Chitin, das aus Garnelenschalen gewonnen werden kann, und ist als Polykation in der Lage, zusammen mit geeigneten Polyanionen (Alginat, Heparin), Hydrogele auszubilden (Kikuchi und Noda, 1976). Als Pulver oder Faser, zu Membranen oder Gelen verarbeitet, kommt Chitosan als Wundbedeckung oder Nahtmaterial zum Einsatz.

### **1.1.2 Bioaktive Oberflächen**

Durch die Implantation biokompatibler Werkstoffe oder Werkstücke kommt es im Allgemeinen, entweder durch den direkten Kontakt des Gewebes mit dem Implantat oder aber durch die beim Einsetzen notwendige Verwundung, zu einer Entzündungs-, eventuell zu einer Fremdkörperreaktion. Im Falle einer ausgeprägten Fremdkörperreaktion oder der Entwicklung einer chronischen Entzündung, beides gefördert durch Abrieb, Abbauprodukte oder aus dem Werkstück eluierte Stoffe<sup>8</sup>, kommt es zur Einkapselung des Fremdkörpers in einen nichtadhärenten Bindegewebssack. Die Abkapselung des Fremdkörpers durch die kaum vaskularisierte fibröse Kapsel dient dem Schutz des umliegenden Gewebes, verhindert allerdings das An- bzw. Einwachsen von Körpergewebe an/in das Implantat. Im Falle einer Hüftprothese bedeutet das die Verhinderung einer regulären Krafteinleitung, so daß es schließlich oftmals zu einer Lockerung des Implantates kommt.

Den biokompatiblen, inerten Werkstoffen werden deshalb bewußt bioaktive Werkstoffe vorgezogen, die eine positive Interaktion des Implantates mit dem Gewebe ermöglichen, so daß es zu einem An- bzw. Einwachsen an das Implantat kommt und eine Isolation verhindert wird. Auf diese Weise kann eine Beeinträchtigung der Versorgung und der Sensorik<sup>9</sup> sowie eine chronische Entzündung vermieden werden.

Bioaktive Implantate können einmal durch die Verwendung intrinsisch bioaktiver Werkstoffe erhalten werden. Diese können natürlichen Ursprungs sein (Kollagen) oder aber synthetisch dargestellt werden (Calciumphosphate<sup>10</sup>, 'Bioglas'<sup>11</sup>). Neben der Verwendung dieser an sich

---

<sup>8</sup> Metalle setzen durch Korrosion Produkte frei, die auf die umliegenden Gewebe einwirken. Edelmetalle (z.B. Pt) oder passivierte Metalle (z.B. Ti) zeigen dabei eine vitale Reaktion (Bildung von lockerem, vaskularisiertem Bindegewebe). Besitzen die durch Korrosion freigesetzten Produkte nur eine schwache Toxizität (z.B. Fe, Al), so kommt es zur Ausbildung einer dichten, nicht vaskularisierten Bindegewebskapsel. Toxische Produkte führen zu schweren Entzündungen und Nekrose (z.B. Co, Ni, V; Steineman, 1980).

<sup>9</sup> Durch eine Fremdkörperreaktion wird beispielsweise ein subkutaner Glukose-Sensor in seiner Funktion behindert (Quinn et al., 1995).

<sup>10</sup> Hydroxylapatit,  $\beta$ -Tricalciumphosphat (TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ).

<sup>11</sup> Bioglas weist gegenüber technischen Gläsern einen niedrigeren  $\text{SiO}_2$ -Gehalt, einen hohen  $\text{Na}_2\text{O}$ - und  $\text{CaO}$ -Gehalt sowie ein hohes  $\text{CaO/P}_2\text{O}_5$ -Verhältnis auf.

bioaktiven Werkstoffe kann die Bioaktivität der Implantate aber auch durch Oberflächenmodifizierung von Werkstoffen und Werkstücken erreicht werden, da für die Wechselwirkung eines biokompatiblen Werkstoffes mit Körpergewebe vor allem seine Oberfläche verantwortlich ist. Neben der Physik spielen dabei auch die Chemie sowie die Topographie eine wichtige Rolle.

Sowohl die physikalischen, chemischen und topographischen Eigenschaften von Oberflächen lassen sich durch Erzeugen oder Einführen geeigneter funktioneller Gruppen beeinflussen. So erhöht sich durch polare Gruppen die Hydrophilie, durch geladene Gruppen ändert sich die Ladung der Oberfläche. Werden diese Gruppen geordnet eingeführt, beispielsweise durch lithographische Techniken, so können gezielt Musterungen erhalten werden. Diese Veränderungen beeinflussen in ihrer Gesamtheit die elektrostatische Wechselwirkung mit und die Adsorption von umgebenden Molekülen. Im direkten Gewebekontakt ist hier besonders die Proteinadsorption von Bedeutung, da sie maßgeblich an der Interaktion zwischen Implantat und benachbarten Zellen beteiligt ist (Zelladhäsion).

Anstelle einer 'zufälligen' Adsorption könnten ausgesuchte Proteine aber auch gezielt zur Adsorption angeboten werden (pre-coating). Einen Schritt weiter geht der Ansatz, diese Proteine über geeignete funktionelle Gruppen kovalent zu binden (Signalpeptide oder Adhäsionsproteine; Massia und Hubbell, 1991).

Die Verfügbarkeit geeigneter Funktioneller Gruppen ist selten ein intrinsisches Merkmal des Werkstoffes, die Gruppen müssen deshalb meist erst auf der Oberfläche eingeführt werden. Ganz allgemein wird dazu die Oberfläche in einem ersten Schritt aktiviert, um anschließend mit einem Molekül zu reagieren, das die gewünschte Funktionalität aufweist oder erzeugt. Die eingeführte Funktionelle Gruppe kann nun für sich die physikalischen Eigenschaften der Oberfläche verändern oder dient der weiteren Umsetzung. Beispielsweise kann über diese Gruppe ein Adhäsionsprotein gebunden werden, das ein gezieltes Anwachsen von Zellen erleichtert (Hern und Hubbell, 1998). Oder es wird über die Anbindung von Polyethylenglykol (PEG) eine Hydrogelstruktur erzeugt, die die Adsorption von Proteinen beeinflusst und somit auch eine Wirkung auf die Zelladhäsion hat.

Durch die sorgfältige Auswahl der kovalent an die modifizierten Oberflächen anzubindenden Moleküle läßt sich eine Vielzahl bioaktiver Oberflächen generieren. Diese 'erweiterte' Bioaktivität ermöglicht die gezielte Anbindung von Zellen, die Unterbrechung einer Signal-



Kaskade oder das Freisetzen von Signalen. So können Implantate endothelialisiert, Entzündungsreaktionen unterdrückt oder Wachstum gefördert werden.

Zumindest die Freisetzung löslicher Antagonisten (Rezeptorblockade) oder Agonisten (positive Wirkung), erfordert die Anbindung dieser Substanzen über labile Bindungen. Da es sich bei vielen der anzubindenden Moleküle um Peptide oder Proteine handelt, wirkt sich ihre Anbindung über Moleküle mit einer abstandhaltenden Funktion, sogenannte 'Spacer', positiv auf den Erhalt ihrer physiologischen Aktivität aus (Hern und Hubbell, 1998; Kantlehner et al., 2000). Es eignen sich hierfür also insbesondere Spacer mit einer internen Bindung, die entweder hydrolytisch oder aber enzymatisch im Körpermilieu gelöst werden kann.

Durch diese Variabilität der Oberflächenmodifizierung ergeben sich ganz neue Möglichkeiten, maßgeschneiderte Zellträgersysteme (scaffolds) zu entwickeln. Ganz allgemein gehört dazu die Anpassung intrakorporaler Implantate an die Erfordernisse einer Zellbesiedlung. Gerade hier bietet sich die Verwendung biodegradierbarer Werkstoffe an, die der bei Besiedlung expandierenden Extrazellulären Matrix der gewebebildenden Zellen Platz schaffen könnten. Allerdings wird auch die *in vitro* Züchtung funktionellen Gewebeersatzes möglich. Dieser Gewebeersatz kann neben der Verwendung im Körper (Zelltransplantation) auch als extrakorporales Organoid verwendet werden. In beiden Fällen kann durch eine schützende, semipermeable Membran eine Abstoßungsreaktion verhindert werden, so daß auch homologe oder xenologe Zellen Verwendung finden können. Sowohl Gewebekulturen als auch Organoiden können außerdem als Testsysteme bei der Entwicklung pharmazeutischer Produkte helfen. Dadurch werden Tierversuche vermieden oder aber Versuche mit humanem Zellmaterial ermöglicht (Langer und Vacanti, 1995). Durch Superstrukturierung der Zellträgersysteme ist später vielleicht die *in vitro*-Züchtung ganzer Organe möglich. Erste Schritte in diese Richtung werden bereits mit Haut- oder Leberersatz unternommen (Yarmush et al., 1992).

## **1.2 Biomaterialien in direktem Gewebekontakt**

### **1.2.1 Gewebe und Gewebeorganisation**

Die aus den verschiedenen biokompatiblen Werkstoffen hergestellten Implantate kommen während ihres Einsatzes unweigerlich mit Körpergewebe in Kontakt. Je nach Einsatzort

werden dabei unterschiedliche Anforderungen an Werkstoff und Werkstück gestellt, da sich der Gesamtorganismus aus verschiedenen Geweben zusammensetzt, die jeweils ganz unterschiedliche Aufgaben erfüllen, durch gewebetypisch differenzierte Zellen charakterisiert sind und je nach Zellumsatz als labil, stabil oder permanent bezeichnet werden. Neben Epithelgewebe, Muskelgewebe und Nervengewebe stellt das sowohl in Funktion als auch in der Zusammensetzung heterogene Binde- und Stützgewebe eine Besonderheit dar. Seine unterschiedlichen Aufgaben - mechanische Unterstützung, Speicherung von Energie und Verbindung und Ernährung von Organen - werden durch unterschiedliche Zellverbände erfüllt. Die Zusammengehörigkeit ergibt sich entwicklungsbiologisch, so daß neben den ortsständigen Geweben auch das frei bewegliche Blutzellsystem dazugerechnet werden kann.

### *1.2.1.1 Bindegewebe, Stützgewebe und Blut*

*Bindegewebe* umschreibt allgemein einen weitmaschigen Verband verschiedener Zelltypen (Fibroblasten/Fibrozyten, Mastzellen, Fettzellen (Adipozyten), Makrophagen (Histiozyten) und Leukozyten), die in reichlich Interzellulärsubstanz<sup>12</sup> eingebettet sind. Oft ist damit das lockere Bindegewebe gemeint, das neben den eigentlichen Bindegewebszellen (Fibrozyten [reife Fibroblasten]) auch Mastzellen, Makrophagen und Eosinophile Granulozyten enthält. Daneben unterscheidet man weiter das dichte (faserige) Bindegewebe (Sehnen und Bänder) und das Bindegewebe mit speziellen Eigenschaften (Fettgewebe, elastische Bänder, retikuläres Bindegewebe).

*Stützgewebe* wird durch Knorpel und Knochen gebildet. Das Knorpelgewebe wird durch Chondrozyten gebildet und besteht unter anderem aus Kollagenfasern, Glykosaminoglykanen und Mineralien und wird unterschieden in Hyalinen- (Nasenscheidewand), Elastischen- (Ohrmuschel) und Faser-Knorpel (Kiefergelenk).

Knochen werden in lange (Röhrenknochen der Extremitäten), kurze (Wirbelkörper) und flache/platte Knochen (Schulterblatt) unterschieden. Sie setzen sich aus der äußeren Kompakta (Kortikalis) und der inneren Spongiosa zusammen und werden außen vom Periost (Knochenhaut), innen an der Kompakta vom Endost umkleidet (Abbildung 1.2.1).

---

<sup>12</sup> Die amorphe Extrazellulärsubstanz enthält neben den Strukturproteinen (Kollagen, Elastin) auch Proteoglykane, die aus einem 'Kernprotein' (core) und daran gebundenen Glykosaminoglykanen (Chondroitinsulfat, Heparansulfat, Hyaluronsäure) zusammengesetzt sind.

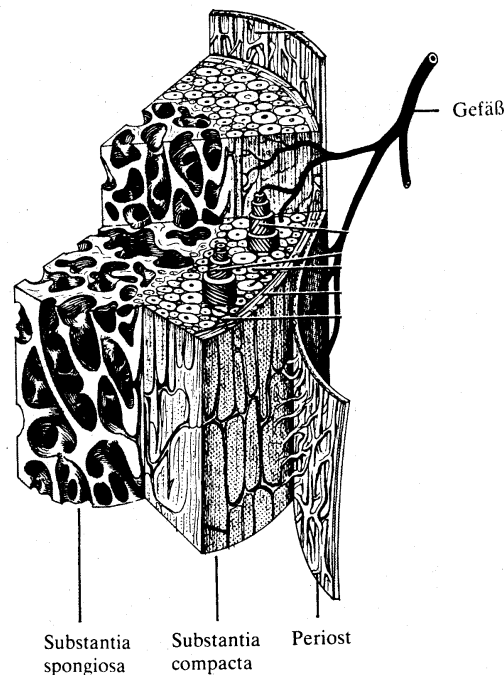


Abbildung 1.2.1: Schematischer Knochenaufbau; entnommen aus: (Rohen, 1998).

Das Knochengewebe übernimmt strukturelle und metabolische Funktionen (Calcium- und Phosphatspeicher). Es besteht zu 70 % aus Mineralien (Knochenapatit) und Kollagen (Typ I), daneben finden sich verschiedene Proteine, die das Knochenwachstum sowie die Verkalkung steuern. Knochen ist anisotrop, kann sowohl auf Zug als auch auf Druck reagieren und wird bei Belastung umgebaut. Die am Aufbau beteiligten Zellen sind die Osteoblasten, sowie deren reife Form, die Osteozyten. Der Umbau geschieht durch die Osteoklasten, die für die Knochenresorption zuständig sind. Nach einer Fraktur erfolgt die Bildung von Granulationsgewebe, das durch Knorpelbildung und anschließende Kalzifikation und Vaskularisierung einen Kallus (überschießendes Neugewebe) bildet, der durch Remodellierung in den endgültigen Knochen umgebaut wird.

Das aus Plasma und den Blutzellen zusammengesetzte *Blut* kann ebenfalls als Gewebe aufgefaßt werden. Es steht über verzweigte Gefäßsysteme mit sämtlichen anderen Geweben in Verbindung und dient hauptsächlich der Ver- und Entsorgung und der Kommunikation. Die Blutzellen - Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten - werden im roten Knochenmark aus myeloischen und lymphatischen Vorläuferzellen gebildet (Hämatopoese, Abbildung 1.2.2).

Die im Blut zirkulierenden Leukozyten (Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten) können aus dem Blutstrom durch die Kapillarwandung (Endothelzellen) in den extravasalen Raum emigrieren und gehören ebenso wie Plasmazellen, Mastzellen und Makrophagen (Histiozyten) zu den beweglichen Zellen der Bindegewebe.

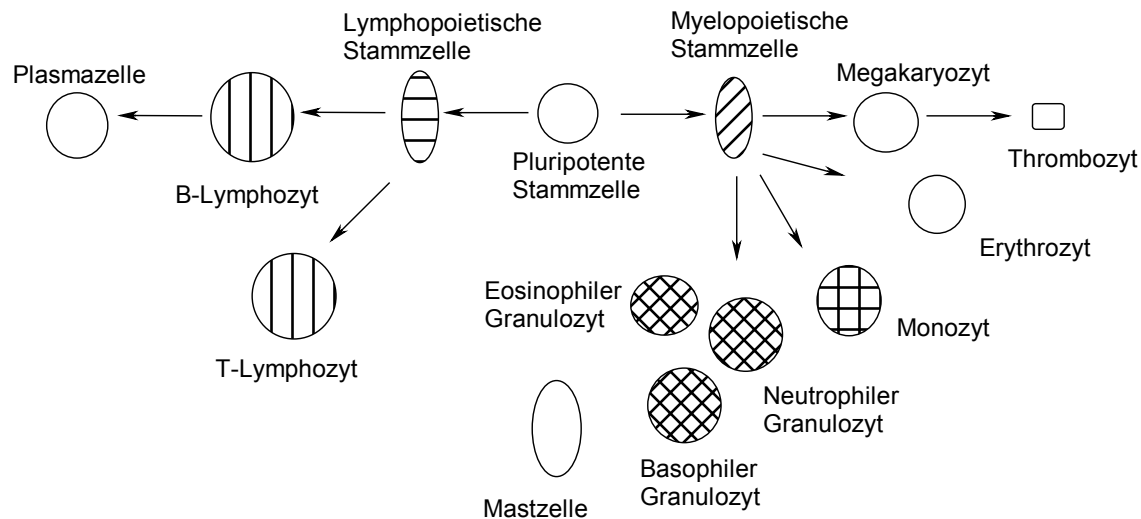


Abbildung 1.2.2: Hämatopoese; nach (Thews et al., 1999).

Die an Hämoglobin reichen Erythrozyten dienen in erster Linie dem Sauerstofftransport und haben ebenso wie die Thrombozyten keinen Zellkern. Die Thrombozyten sind für die Hämostase verantwortlich. Durch Oberflächenkontakt mit subendothelialen Strukturen (Basallamina, Kollagen, Fremdoberflächen) werden sie aktiviert und setzen Gerinnungsfaktoren und Entzündungsmediatoren frei.

Die Leukozyten - Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten - können morphologisch oder über Differenzierungsantigene (CD-System) unterschieden werden. Nach der Kernmorphologie unterscheidet man mononukleäre Leukozyten (Lymphozyten und Monozyten) und polymorphkernige Leukozyten (Granulozyten). Sie übernehmen im Körper durch Antikörperbildung, zytotoxische Aktivität und Phagozytose Abwehr- und Entsorgungsfunktionen.

Granulozyten lassen sich durch Anfärben ihrer Granula in Neutrophile-, Basophile- und Eosinophile Granulozyten unterscheiden, nach der Form ihrer Kerne in Stab- und Segmentkernige Granulozyten (junge und reife Granulozyten). Die Neutrophilen Granulozyten, oft als PMNs (polymorphonuclear neutrophils) bezeichnet, stellen mit etwa 50 -75% der gesamten Leukozyten die größte Population und sind neben den aus emigrierten Monozyten gebildeten Makrophagen die wichtigsten phagozytierenden Zellen. Die Granula

enthalten verschiedene Enzyme, die bei Vereinigung mit den durch Phagozytose entstandenen Phagosomen zum Verdau des internalisierten Fremdkörpers beitragen.

Lymphozyten lassen sich vor allem durch ihre Oberflächenantigene in B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und NK-Zellen ('natural killer') unterscheiden. Die T-Lymphozyten werden weiter in T-Helferzellen (Kontrolle der Antikörperproduktion, Unterstützung der Phagozytose) und zytotoxische T-Zellen (Lyse und Apoptoseeinleitung) unterteilt, die B-Lymphozyten dienen nach ihrer Transformation zu Plasmazellen der Antikörperproduktion. Die NK-Lymphozyten schließlich dienen der antikörpervermittelten Zell-Lyse (Perforine, Granzyme).

#### *1.2.1.2 Gewebeorganisation*

Gewebe als Verbände gleichartiger Zellen können nur entstehen, wenn diese miteinander kommunizieren und einen Zusammenhalt bilden. Dazu stehen die Zellen über direkte und indirekte Kontakte in Verbindung. Die zwischen den Zellen befindlichen Interzellularräume werden durch die Extrazelluläre Matrix (ECM) ausgefüllt, die aus Proteoglykanen, Faser- und Glykoproteinen besteht und der räumlichen Organisation, dem Schutz und der Ernährung sowie der Kommunikation (Übertragung von Signalen) der Zellen dient. Viele Zellen werden von einer Basalmembran, die ebenfalls der extrazellulären Matrix angehört, entweder einseitig (Endothelzellen) oder ganzseitig (Fettzellen) umgeben (Fibroblasten sind aber beispielsweise nicht von Basalmembranen umgeben). Die Basalmembran setzt sich (bei Epithelgewebe) aus vier unterschiedlichen Zonen zusammen, an die sich die *lamina propria* als Teil des Bindegewebes anschließt (Abbildung 1.2.3):

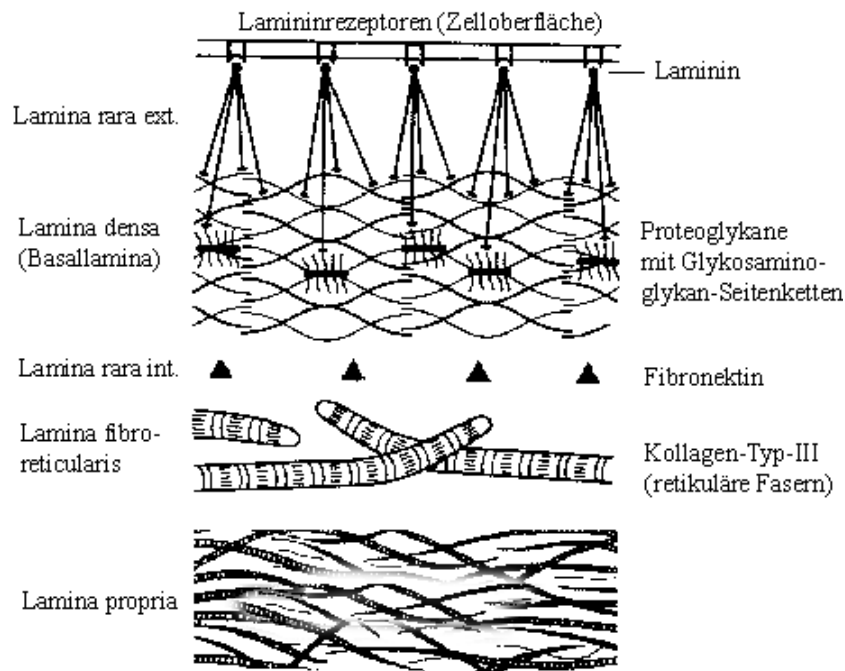


Abbildung 1.2.3: Schematischer Aufbau einer Basalmembran; entnommen aus (Junqueira und Carneiro, 1996).

Die Wechselwirkung zwischen den Zellen und der sie umgebenden Matrix erfolgt bidirektional über Zelloberflächenproteine (Adhäsionsrezeptoren) sowie die in der Matrix immobilisierten oder mobilen Glykoproteine (Adhäsionsproteine und Signalproteine), die sowohl eine Verankerung als auch eine biochemische und biomechanische Signalübermittlung ermöglichen.

Zu den Adhäsionsrezeptoren zählen neben den Cadherinen (homophile Zell/Zell-Wechselwirkung) und Selektinen (heterophile Zell/Zell-Wechselwirkung) auch die Proteine der Immunglobulin Superfamilie (CAMs<sup>13</sup>, homophile und heterophile Zell/Zell-Wechselwirkung) sowie die Integrine (heterophile Zell/Zell- und Zell/Matrix-Wechselwirkung). Integrine sind Protein-Dimere, die sich aus nicht kovalent verbundenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten (mindestens 21 Kombinationen; Wilson, 1996) zusammensetzen.

Die Zell-Matrix-Kontakte erfolgen mit den (neben Kollagen) in der Matrix befindlichen Glykoproteinen (Laminin, Fibronektin u.a.). Fibronektin kann sowohl an Integrine (Zellen) als auch an Kollagen (Matrix) binden, so daß eine Verbindung der Zellen mit der extrazellulären Matrix auch dann erfolgt, wenn keine Basallamina vorhanden ist (Abbildung 1.2.4).

<sup>13</sup> Cell Adhesion Molecules

Laminin, ein über Disulfidbrücken verbundenes Trimer weist ebenfalls unterschiedliche Bindungsdomänen sowohl für die Bindung an Kollagen, Glykosaminoglykane (heparinbindende Domäne, wenig spezifisch) und Integrine (Epithel- und Endothelzellen) auf (RGD- oder SIKVAV- Motiv).

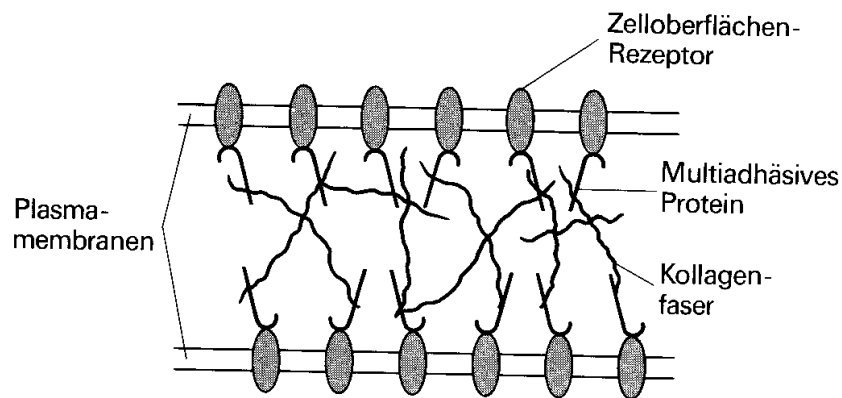


Abbildung 1.2.4: Schematische Darstellung der Extrazellulären Matrix (Darnell et al., 1994).

### 1.2.2 Entzündungsreaktionen

Die typischen (makroskopischen) Merkmale einer akuten Entzündung sind lokale Rötung, Schwellung, Überwärmung und Schmerz. Auf zellulärer Ebene spielen sich dabei je nach Typus der Entzündung (exsudativ, proliferativ, granulomatös) unterschiedliche Vorgänge ab, die allerdings nach einem ähnlichen Schema ablaufen.

Die Entzündung dient der Beseitigung einer endogenen oder exogenen Noxe und der durch sie eventuell erfolgten Gewebeschädigung durch daran anschließende Wiederherstellung (reparative Regeneration). Ausgelöst wird eine Entzündung durch einen in den Körper eingedrungenen oder eingebrachten Fremdkörper (wenn er als solcher erkannt wird) oder aber die Schädigung körpereigener Zellen. Die Steuerung der Entzündung geschieht über ein komplexes Netzwerk aus Mediatoren und Zytokinen (Protein-Mediatoren, die in Zielzellen rezeptorvermittelt spezifische Wirkungen ausüben).

Ortsständige Gewebemakrophagen (bei Fremdkörperkontakt) oder geschädigte Fibroblasten bilden Entzündungsmediatoren. Diese wirken auf Endothelzellen, die nach ihrer Aktivierung weitere Zytokine bilden und Adhäsionsmoleküle (Selektine) auf ihrer Oberfläche präsentieren. Durch lokale Erweiterung der Blutgefäße kommt es zu einer Verlangsamung des Blutstroms, so daß sich Leukozyten (Phagozyten) über die Selektine an das Endothel anlagern

können. Nach der Anlagerung emigrieren die Phagozyten (PMNs, Monozyten) durch Diapedese (Extravasation) aus den Gefäßen (postkapilläre Venolen) ins Gewebe (Extravasalraum) und migrieren, geleitet durch chemotaktische Substanzen (Peptide und Polysaccharide von Mikroben, Zytokine, Komplementfaktoren und Mediatoren, an den Ort der Entzündung (schnelle Antwort durch Granulozyten, später Monozyten/Makrophagen). Diese Vorgänge werden zusammengefaßt als Rekrutierung bezeichnet. Durch die gesteigerte Durchblutung und Permeabilität der Kapillaren (Histamin) erfolgt außerdem ein Einstrom von Plasmaproteinen (Immunglobuline, Komplementfaktoren, Fibrinogen) und schließlich auch die Einwanderung von Lymphozyten. Durch die anwesenden Phagozyten werden der/die Fremdkörper sowie eventuelle Zelltrümmer phagozytiert. Gleichzeitig erfolgt im Sinne einer Steuerung des Ausmaßes der Entzündung die Freisetzung verschiedener Zytokine und Mediatoren. Eine Übersicht verschiedener Mediatoren gibt Tabelle 1.2.1.

Tabelle 1.2.1: Übersicht Entzündungsmediatoren - Beeinflußung der Blutversorgung, der vaskulären Permeabilität sowie Chemotaxis und Aktivierung der Leukozyten und anderer Zellen

Mediator	Herkunft
Histamin	Mastzellen
Serotonin	Thrombozyten
Plättchenaktivierungs-Faktor	Neutrophile, Makrophagen
Neutrophilen-chemotaktischer Faktor	Mastzellen
Interleukin 8	Lymphozyten
Komplement-Faktoren C3a, C5a	Komplementsystems
Eikosanoide: Prostaglandine	Cyclooxygenase-Pathway
Leukotriene	Lipoxygenase-Pathway
Bradykinin	Kallikrein-Kinin-System
Fibrinabbauprodukte	Gerinnungssystem
f-Met-Leu-Phe	Bakterien
Reaktive Sauerstoff-Spezies	Phagozyten

Die in den Blutkreislauf gelangenden Zytokine und Akute-Phase-Proteine (C-reaktives Protein, Protease-Inhibitoren, Transportproteine, Gerinnungsfaktoren, Komplement-Komponenten) lösen systemische Reaktionen aus.



Zu den Zytokinen gehören:

- Interleukine (IL)
- Interferone (INF)
- Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF)
- Koloniestimulierende Faktoren (CSF)
- Wachstums-Faktoren (GF)
- Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF)
- Stammzellfaktor (SCF), Erythropoietin (EPO), Thrombopoietin (TPO)

Nach erfolgter Phagozytose vereinigt sich das Phagosom mit den in den Phagozyten vorhandenen Granula (Lysosomen), so daß die nun im Phagolysosom befindlichen Partikel durch verschiedene Enzyme (Hydrolasen) und enzymatisch erzeugte reaktive Sauerstoffspezies (Superoxidanionradikal, Stickstoffmonoxid und Folgeprodukte) abgebaut werden können. Zur Aufrechterhaltung eines antimikrobiellen Milieus wird ein Teil der reaktiven Sauerstoffspezies und Enzyme (die außerdem einen Abbau der Matrix bewirken, so daß nach Einwandern der Fibroblasten neues Granulationsgewebe Platz findet), aus den Phagozyten freigesetzt. Im Idealfall wird das schädigende Agens rasch beseitigt, die Reaktion klingt ab und das zerstörte Gewebe wird wiederhergestellt. Bei andauernder Stimulation können sich die Gewebsmakrophagen in epitheloide Zellen umwandeln, die nach Verschmelzung Fremdkörperriesenzellen bilden.

Hält ein schädigender Reiz längere Zeit an, so kommt es zur Aktivierung der spezifischen Abwehr, an der neben dem Komplementsystem und den durch Plasmazellen erzeugten Antikörpern vor allem die B-Lymphozyten sowie die T-Lymphozyten und die NK-Zellen beteiligt sind. Sowohl die unspezifische (angeboren) als auch die spezifische (erworben) Abwehr erfolgt kooperativ humoral und zellulär, beide sind dabei nicht unabhängig voneinander. Letztlich gelingt durch Opsonierung eine Neutralisation (Präzipitation, Agglutination, Immobilisation), durch Phagozytose eine Beseitigung von Fremdkörpern.

Ganz ähnlich sind die Abläufe während der Wundheilung. Eine Wunde entsteht, wenn Deckgewebe beschädigt oder Bindegewebe getrennt wird. Zusätzlich spielen hier allerdings auch die Thrombozyten eine wichtige Rolle (Hämostase). Parallel zur Kontrolle der Blutstillung und Blutgerinnung (plasmatisches Gerinnungssystem) tragen sie durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren ebenfalls zur Modulation der Entzündung und über

die Beeinflussung der Fibroblastenproliferation zur Wundheilung bei. Die zur Wundheilung notwendige Fibrinolyse geschieht mit Hilfe von Proteasen (Urokinase, Plasmin).

Unterteilt man die Wundheilung in Substrat-, Proliferations- und Differenzierungsphase, so versteht man unter der Substratphase einmal die sich direkt an die Verwundung anschließenden Vorgänge (exsudative Phase) und außerdem die zur Wundheilung notwendige Resorption der Blutgerinnsel und nekrotischen Gewebes (resorptive Phase). Das Debridement (Wundausschneidung) erfolgt (neben der induzierten Fibrinolyse) vorwiegend durch Makrophagen (Phagozytose von Detritus) in einem durch Sauerstoffradikale und Stickstoffmonoxid antimikrobiellen Milieu.

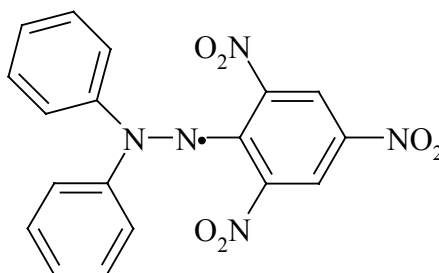
Während der Proliferationsphase kommt es zur Einwanderung und Aktivierung von Fibroblasten und zur Kapillarsprossung des Endothels (Angiogenese). Die Fibroblasten produzieren Glykoproteine, Proteoglykane und schließlich Kollagen (Matrixsynthese), so daß junges Bindegewebe (Granulationsgewebe) entsteht. Schließlich kommt es in der Differenzierungsphase durch die Verminderung der Zellzahl, verstärkte Produktion von Interzellularsubstanz (faserreiches Bindegewebe) sowie eine dynamische Remodellierung zur Bildung von Narbengewebe.

## **1.3 Entzündungsinduzierte Modifikationen an Proteinen**

### **1.3.1 Vorkommen und Reaktionen von Radikalen im Organismus**

Radikale sind Moleküle oder Atome mit zumindest einem ungepaarten Elektron. Sie sind im Allgemeinen bestrebt, sich rasch mit anderen Molekülen oder Atomen zu verbinden und lassen sich durch Energiezufuhr (Thermolyse, Photolyse, Radiolyse) oder durch Redoxreaktionen mit Eielektronenübergängen generieren. Sie können rekombinieren, dimerisieren, disproportionieren und sich umlagern. Die in Gegenwart 'Organischer Verbindungen' maßgeblichen Radikale sind Alkyl-Radikale (C-Radikale) sowie verschiedene Hetero-Radikale (O-, N-, S-Radikale), typische Reaktionen sind die Addition an C=C-Doppelbindungen (Halogenierung, im weiteren Sinne auch Polymerisation) sowie die Substitution nach einem Abstraktions/Substitutions(Additions)-Mechanismus bei Aliphaten bzw. eines Additions/Eliminierungs-Mechanismus bei Aromaten. Eines der ersten genauer untersuchten Radikale war das relativ langlebige Triphenylmethyl-Radikal (1900), das über Delokalisierung stabilisiert ist. Ein weiteres über Delokalisierung stabilisiertes Radikal ist das

1,1-Diphenyl-2-pikrylhydrazyl-Radikal (DPPH **2**), das außerdem aufgrund seiner Sterik nicht mit sich selber reagieren kann (wohl aber mit anderen Radikalen).

DPPH **2**

Durch ihr ungepaartes Elektron lassen sich Radikale mittels Elektronenspin-Resonanz Spektroskopie nachweisen. Schnellebige Radikale können dazu durch Spintrapping<sup>14</sup> stabilisiert und so der Untersuchung zugänglich gemacht werden.

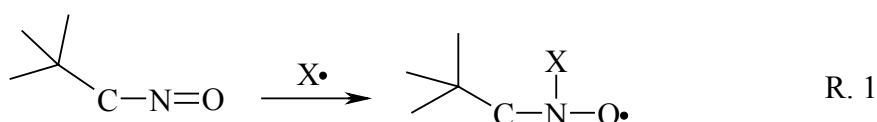


Abbildung 1.3.1: Stabilisierung eines Radikals durch Spintrapping

Radikale spielen bei vielen physiologischen Reaktionen als Intermediate (katalytische Zentren in Enzymen, Elektronenübertragungsreaktionen) sowie als Signalmoleküle (NO)<sup>15</sup> eine wichtige Rolle. Neben den durch exogenen Einfluß (ionisierende Strahlung, Metabolisierung von Xenobiotika) im Körper erzeugten Radikalen tragen vor allem die Vorgänge in der mitochondrialen Atmungskette (Sauerstoff-Metabolismus) zur endogenen Radikalbelastung bei (Cadenas, 1995). Dabei spielt aufgrund der strikten Kontrolle (Buse et al., 1999) aber nicht die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) mit der Reduktion von Sauerstoff durch vier Eielektronenübergänge die entscheidende Rolle. Vielmehr das durch die NADH-Dehydrogenase (Komplex I) sowie die Succinat-CoQ-Reduktase (Komplex II) reduzierte Ubichinon (Q), das der Übertragung von Elektronen auf den Eielektronenakzeptor Cyt b in der CoQ-cytochrom-c Reduktase (Komplex III) dient (Abbildung 1.3.2).

<sup>14</sup> Als Spintrap bezeichnet man Verbindungen (Radikalfänger), die mit kurzlebigen Radikalen zu relativ stabilen Radikalen reagieren.

<sup>15</sup> Stickstoffmonoxid, früher als Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF) bezeichnet (Moncada et al., 1988) wirkt in den Blutgefäßen, im Gehirn und im Magen-Darm-Trakt (Ignarro et al., 1999).

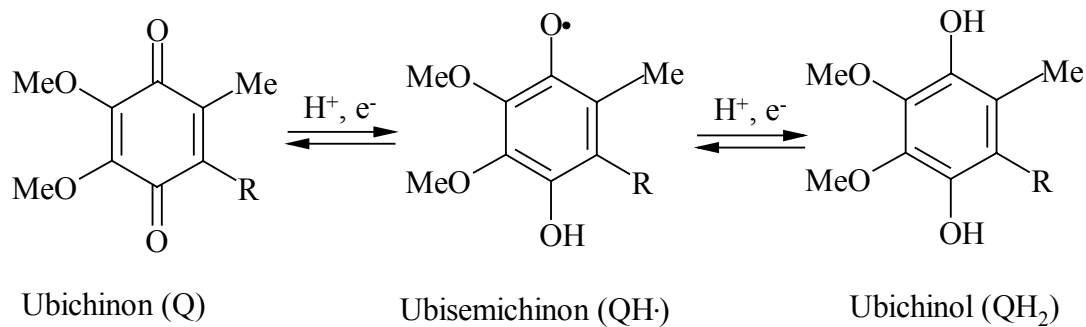


Abbildung 1.3.2: Redoxzustände des Ubichinons im Q-Zyklus.

Das dabei in diesem Q-Zyklus auftretende Semichinon-Radikal kann durch Di-Sauerstoff unter Bildung eines Superoxid-Anion-Radikals oxidiert werden (Finkel und Holbrook, 2000) (Abbildung 1.3.3).

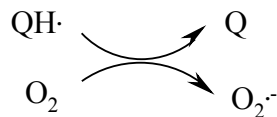


Abbildung 1.3.3: Oxidation des Semichinon-Radikals unter Bildung von Superoxid-Anion-Radikalen.

Auf diese Weise werden bis zu 2% des insgesamt in der Atmungskette umgesetzten Sauerstoffs in das Superoxid-Anion-Radikal umgewandelt (Boveris und Chance, 1973). Auch die Molybdän-abhängige Xanthin-Oxidase (XO) trägt, sowohl indirekt (Abbildung 1.3.4) als auch direkt (R. 2), zur Radikalbelastung bei (Lacy et al., 1998):

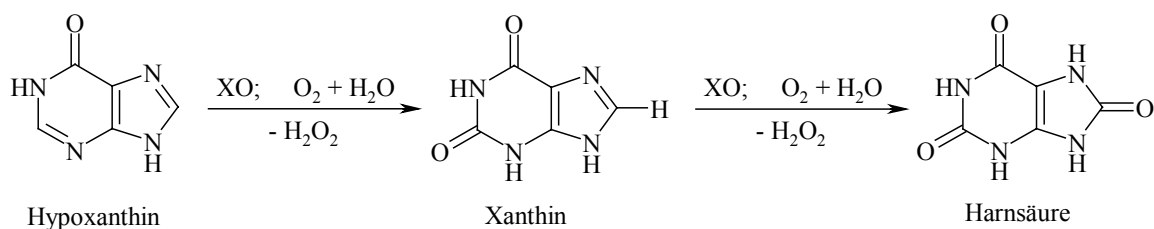
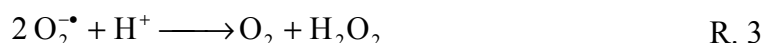


Abbildung 1.3.4: Bildung von Wasserstoffperoxid durch die Umwandlung von Hypoxanthin zu Harnsäure.

Außer Wasserstoffperoxid kann auch das Superoxid-Anion-Radikal freigesetzt werden (R. 2):



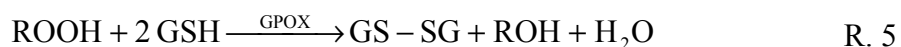
Das Superoxid-Anion-Radikal disproportioniert entweder spontan oder aber durch Katalyse zum weit weniger reaktiven Wasserstoffperoxid (R. 3). Die spontane Disproportionierung der konjugierten Säure (Hydroxylperoxyl-Radikal, pKa 4,6) verläuft auch ohne Katalyse relativ rasch.



Die Katalyse geschieht dabei durch die Superoxid-Dismutase (SOD), die als MnSOD vor allem in den Mitochondrien, als CuZnSOD im Cytosol zu finden ist. Das entstehende Wasserstoffperoxid wird durch die Catalase (CAT), einem ebenfalls in den Mitochondrien und dem Cytosol auftretenden Enzym, zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt (R. 4)



Ein weiteres wichtiges Enzym zur Vermeidung einer Schädigung des Organismus durch freie Radikale ist die im Cytosol befindliche spezifische Selen-abhängige Glutathion-Peroxidase (GPOX) (sowie die Glutathion Transferase (GSTs), die ebenfalls Peroxidase-Aktivität aufweist) (R. 5).

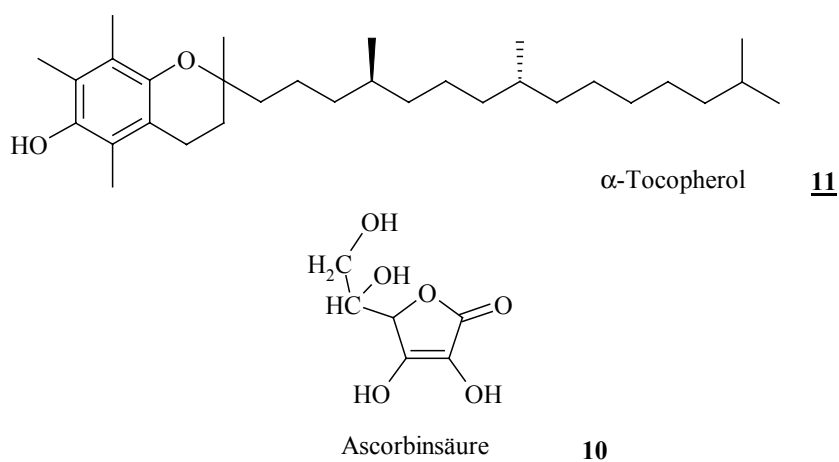


Sowohl die SOD, CAT und GPOX als auch die nicht-Proteine Ascorbinsäure **10**,  $\alpha$ -Tocopherol **11**,  $\beta$ -Carotin oder Glutathion werden als primäre Antioxidantien bezeichnet und sollen eine radikalinduzierte Schädigung an Proteinen, Lipiden und DNA<sup>16</sup> nach Möglichkeit

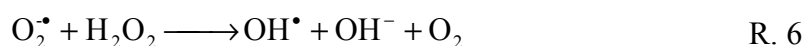
---

<sup>16</sup> Die in (Podmore et al., 1998) beschriebene erhöhte Oxidationsrate der DNA nach Einnahme größerer Mengen Vitamin C zeigt, daß auch Antioxidantien nicht ausschließlich positive Eigenschaften aufweisen.

verhindern. Kommt es dennoch zu Schädigungen, so werden diese - wenn möglich - durch sekundäre Antioxidantien (Reparatur-Enzyme) behoben oder begrenzt.<sup>17</sup>



Das durch die Reaktionen der Xanthin-Oxidase sowie unter Einfluß der Superoxid-Dismutase entstehende Wasserstoffperoxid kann durch Aufnahme eines Elektrons zum überaus reaktiven Hydroxyl-Radikal reduziert werden, das aufgrund seines großen Standard-Reduktionspotentials ( $E^{\circ} = 2,31 \text{ V}$ )<sup>18</sup> in der Lage ist, die meisten in seiner direkten Nachbarschaft befindlichen Molekül zu oxidieren. Das zur Reduktion übertragene Elektron stammt dabei entweder vom Superoxid-Anion-Radikal (R. 6) oder aber von einem Übergangsmetall-Ion ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\text{Cu}^{\text{I}}$ ) (Fenton-Reaktion, (Fenton, 1894; Vissers und Winterbourn, 1991a; Vissers und Winterbourn, 1991b)).



Neben der beständigen endogenen Radikalbelastung tragen in besonderem Maße die Vorgänge während der zellulären Abwehr von Fremdkörpern zum Oxidativen Stress des Organismus bei.

<sup>17</sup> Neben der exogenen Radikalbelastung trägt in besonderem Maße auch die endogene Radikalbelastung zu vielen Prozessen bei, die mit pathologischen Veränderungen und im Besonderen mit Alterung in Verbindung gebracht werden (Theorie der Freien Radikale). Daneben werden für diese Vorgänge aber auch andere Ursachen diskutiert (Abnutzungstheorie, genetische Determiniertheit, replikative Senescence).

<sup>18</sup>  $E^{\circ} = (E)_{\text{pH}=7, \text{CRED}=\text{COX}}$

Im Mittelpunkt stehen dabei die NADPH-Oxidase sowie die iNO-Synthase (induzierbare NO-Synthase, eine von drei Isoformen), die beide in Phagozyten (Neutrophile Granulozyten und Makrophagen) vorkommen und für den sogenannten 'respiratory burst' <sup>19</sup> verantwortlich sind (Abbildung 1.3.5).

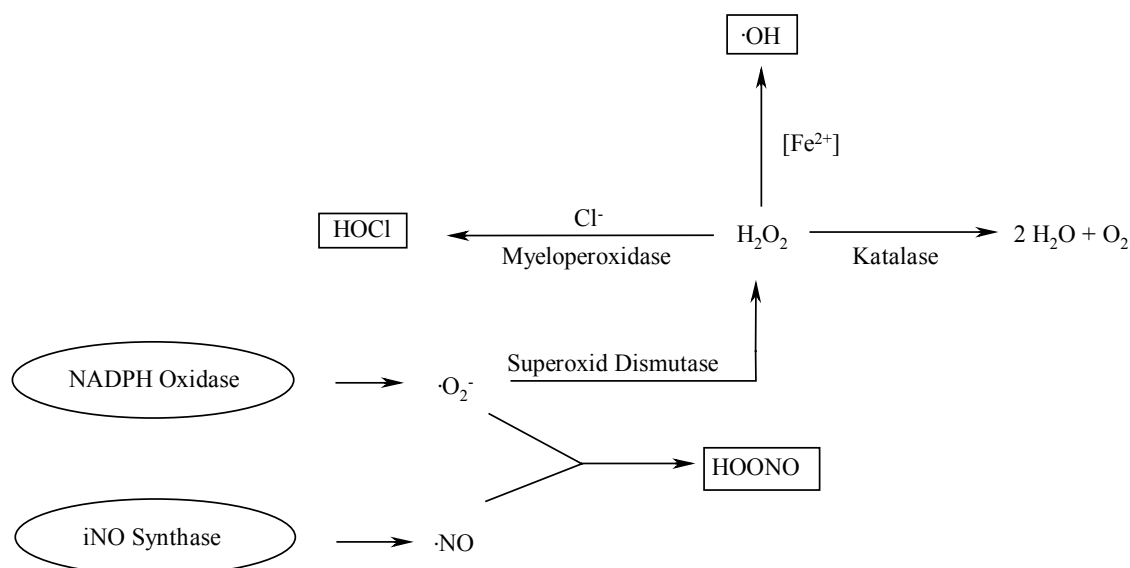


Abbildung 1.3.5: Übersicht der durch die NADPH-Oxidase sowie die iNO-Synthase gebildeten Radikale sowie daraus gebildeter Folgeprodukte.

Die NADPH-Oxidase ist ein Enzymkomplex, der sich aus einem membrandurchspannenden Heterodimer und verschiedenen cytosolischen Proteinen zusammensetzt (Abbildung 1.3.6). Das Heterodimer ist ein Flavo-Hämprotein mit einem Cyt b<sub>558</sub> und befinden sich vor der Assemblierung der Oxidase in sekretorischen Vesikeln und den spezifischen Granula (Babior, 1999). Den kompletten Enzymkomplex findet man sowohl in der Plasmamembran sowie in den Membranen der Phagolysosomen. Die Maximale Aktivität der Oxidase wird etwa drei Minuten nach ihrer Aktivierung beobachtet, nach etwa einer Stunde hört die Bildung von Superoxidanionradikalen auf.

<sup>19</sup> Während der Aktivierung der PMNs kann ein sprunghafter Anstieg des Sauerstoff-Verbrauchs nachgewiesen werden ("respiratorischer Schub").

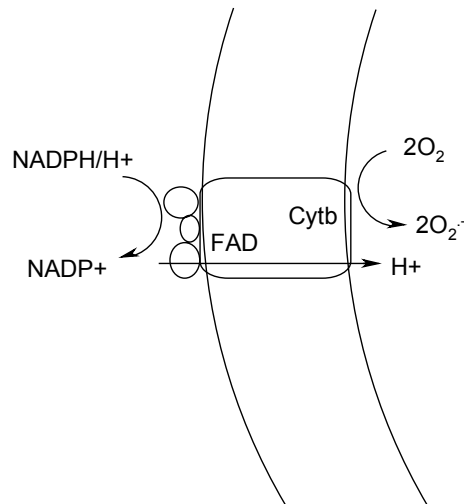


Abbildung 1.3.6: Schematische Darstellung der NADPH-Oxidase.

Von der NO-Synthase sind bei Säugetieren bisher drei Isoformen bekannt, die neuronale NOS (NOS-I; nNOS), die endotheliale NOS (NOS-III; eNOS) sowie die induzierbare NOS (NOS-II; iNOS). Alle drei Synthasen sind in der Lage, aus L-Arginin unter Sauerstoffverbrauch NO zu generieren, das als Mediator in vielen verschiedenen biologischen Prozessen fungiert und dort vaskuläre, neurologische sowie immunologische Reaktionen steuert. Das Enzym ist ein Homodimer und enthält FAD, FMN sowie Häm (Parkinson, 1997) (Abbildung 1.3.7).

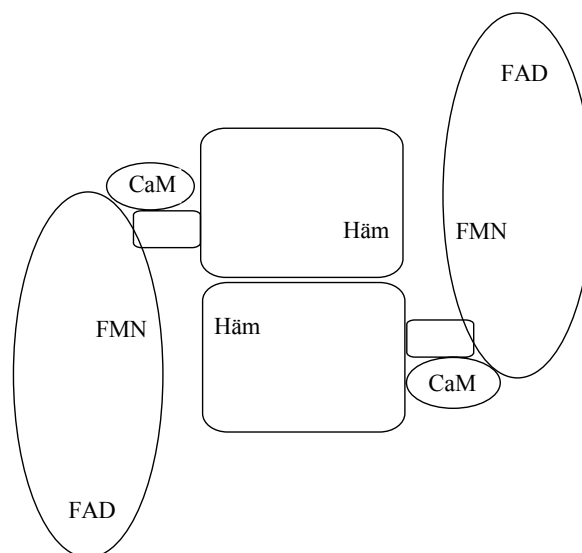


Abbildung 1.3.7: Schematische Darstellung der NO-Synthase; CaM - Calmodulin

Als Cofaktor dient Tetrahydrobiopterin (BH4) (allosterischer Regulator), als Substrate dienen NADPH, O<sub>2</sub> sowie L-Arginin. Für maximale Aktivität werden *in vitro* zudem noch reduzierte



Thiole (Dithiothreitol,  $\beta$ -Mercaptoethanol, Glutathion) benötigt. Die konstitutiven NOS-I und -III werden reversibel durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin aktiviert, die induzierbare NOS-II enthält Calmodulin (CaM) als integrale Untereinheit und wird nicht durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert. NOS-I und -III sind membran-assoziiert. Über NOS-II ist noch wenig bekannt, es ist jedoch klar, daß sie in der Abwehr und bei Entzündungen eine wichtige Rolle spielt. Die Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin und NO erfolgt in einer Zweistufen-Reaktion, das Stickstoffmonoxid stammt dabei aus der Guanidino-Gruppe des Arginins (Griffith und Stuehr, 1995) (Abbildung 1.3.8).

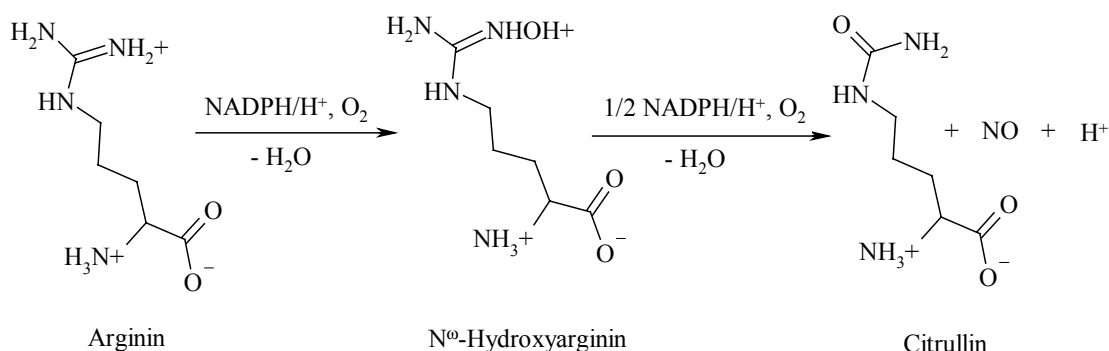
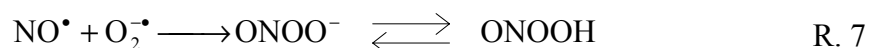


Abbildung 1.3.8: Reaktionsschema der NO-Bildung aus L-Arginin.

Stickstoffmonoxid wird in wäßrigen Lösungen langsam zum Nitrit-Anion, anschließend zum Nitrat-Anion oxidiert<sup>20</sup>. Trifft NO allerdings auf ein Superoxidanion-Radikal, so kann es zur Peroxosalpetrigen Säure reagieren (R. 7). Die Säure selber ist instabil, nicht aber das Anion.

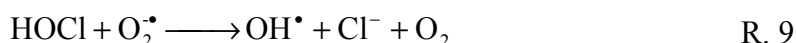


Ein weiteres Enzym, das eine wichtige Rolle bei der Fremdkörperabwehr spielt, ist die in den Polymorphkernigen Granulozyten zu findende Myeloperoxidase (MPO). Das Enzym katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid und Chloridionen zu Hypochloriger Säure (R. 8) (Vissers und Winterbourn, 1991a; Vissers und Winterbourn, 1991b) und befindet sich in den spezifischen Granula. Durch die Vereinigung der Granula mit einem Phagosom wird es in das entstehende Phagolysosom freigesetzt.

<sup>20</sup> Nitrit, oftmals über die Griess-Reaktion im Urin nachgewiesen und bestimmt, gilt denn auch als Indikator für eine im Körper auftretende Entzündung.



Die an sich schon reaktive Hypochlorige Säure kann durch die Reaktion mit einem Superoxidanion-Radikal in das weitaus reaktivere Hydroxyl-Radikal überführt werden (R. 9).



Diese Reaktion ist deshalb besonders interessant, da die Hypochlorige Säure auf diese Weise als "Transporter" für OH-Radikale, die ansonsten nur eine geringe mittlere freie Weglänge hätten, fungieren kann (Saran et al., 1999). Trifft ein durch Oxidation entstandenes Nitrit-Anion auf ein Molekül Hypochlorige Säure, so entsteht außerdem das sehr reaktive Nitrylchlorid Cl-NO<sub>2</sub> (R. 10) (Eiserich et al., 1996; Eiserich et al., 1998).



### 1.3.2 Einwirken reaktiver Spezies auf Proteine

Die korporale Antwort auf Implantate kann durch die bioaktive Ausstattung der Implantat-Oberflächen mit physiologisch aktiven Peptiden oder Proteinen positiv beeinflusst werden. Die so ausgestatteten Oberflächen können (neben mechanischer Beschädigung) allerdings durch die beim Einsetzen des Implantates auftretenden entzündlichen Reaktionen eine Modifizierung erfahren, die eine gewünschte Reaktion mindert oder aber ganz verhindert. Die Veränderungen an den Proteinen während einer solchen entzündlichen Reaktion werden durch aus den Neutrophilen Granulozyten oder den Makrophagen freigesetzte Enzyme und Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) verursacht. Die Reaktiven Sauerstoff-Spezies leiten sich im Wesentlichen von nur zwei Molekül-Spezies ab, dem Superoxid-Anion-Radikal (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) sowie dem Stickstoff-Monoxid-Radikal (NO). Die aus dem NO-Radikal hervorgehenden Spezies werden manchmal auch als Reaktive Stickstoff Spezies (RNS) bezeichnet.

Ausgehend vom Superoxid-Anion-Radikal, das entweder spontan oder aber durch Katalyse zu Wasserstoffperoxid dismutiert, entstehen im Zusammenwirken mit reduktiven Metallionen, mit NO sowie durch die Reaktion der Myeloperoxidase eine Vielzahl ROS, die alle in der Lage sind, Proteine zu verändern.

Das aus Wasserstoffperoxid und  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\text{Cu}^{\text{I}}$  oder  $\text{O}_2^{\cdot-}$  entstehende Hydroxylradikal ist dabei, neben der Hypochlorigen Säure ( $\text{HOCl}$ ) und der Peroxosalpetrigen Säure ( $\text{HOONO}$ ), das eigentlich schädigende Agens (Abbildung 1.3.9).

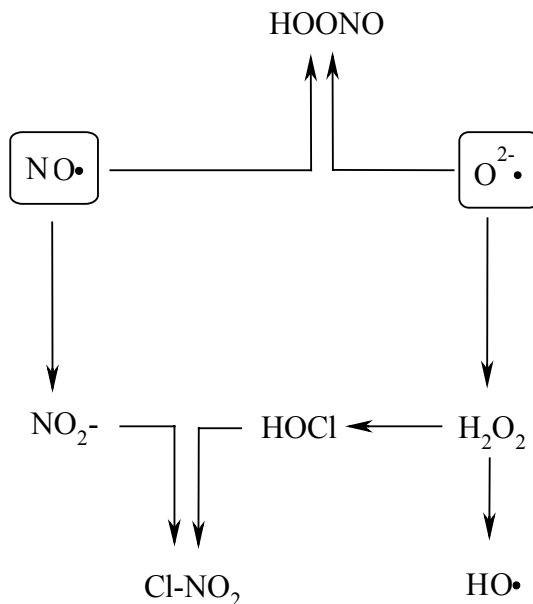
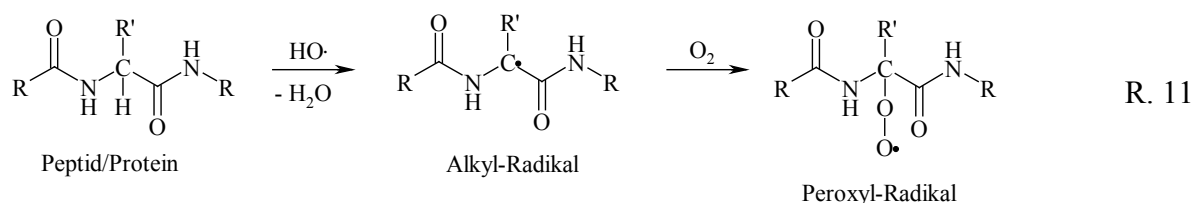


Abbildung 1.3.9: Übersicht der wichtigsten "Reactive Oxygen Species" (ROS).

### 1.3.2.1 Reaktionen des Hydroxylradikals

Aufgrund seines großen Redoxpotentials ist das Hydroxylradikal in der Lage, mit nahezu allen in seiner Umgebung befindlichen Molekülen zu reagieren, wobei die Reaktionen im Allgemeinen sehr schnell ablaufen.

Durch den Angriff eines  $\text{OH}^\bullet$ -Radikals an einem  $\alpha$ -C-Atom einer Peptidkette wird unter Wasserbildung ein Wasserstoff-Atom abstrahiert. Das dabei gleichzeitig gebildete Alkyl-Radikal führt in Abwesenheit von Disauerstoff durch Dimerisierung zu intra- und intermolekularer Quervernetzung der Peptidketten. In Gegenwart von Disauerstoff wird dieser unter Bildung eines Peroxyl-Radikals angelagert (R. 11):



Ausgehend vom Peroxyl-Radikal führen unterschiedliche Reaktionen über eine Vielzahl Intermediate letztlich zur Bildung eines Alkoxy-Radikals. Dieses kann entweder zum Hydroxylderivat **12** reduziert werden, oder aber zur Fragmentierung der Peptidkette führen. Die Fragmentierung über ein Imino-Derivat führt zur Bildung eines Amins sowie eines  $\alpha$ -Ketoacyls **13**. Die Fragmentierung über eine  $\beta$ -Spaltung führt zur Bildung eines Diacylamins sowie eines Isocyanats **14**, das weiter zu einem Amin und  $\text{CO}_2$  hydrolysiert wird <sup>21</sup>.

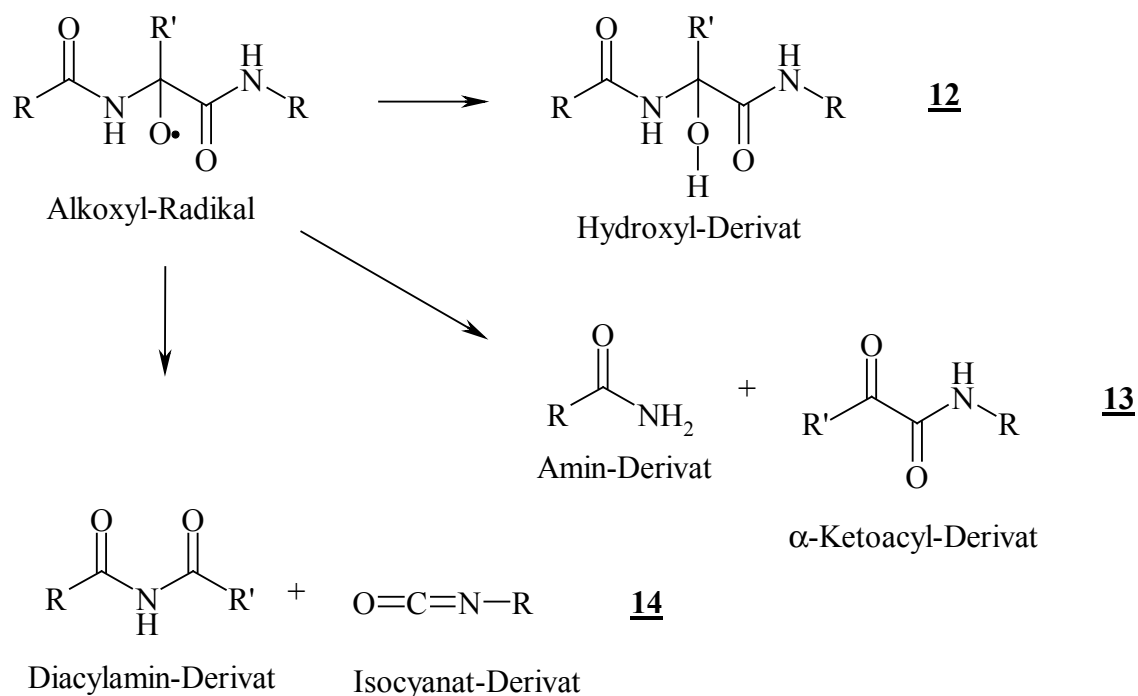


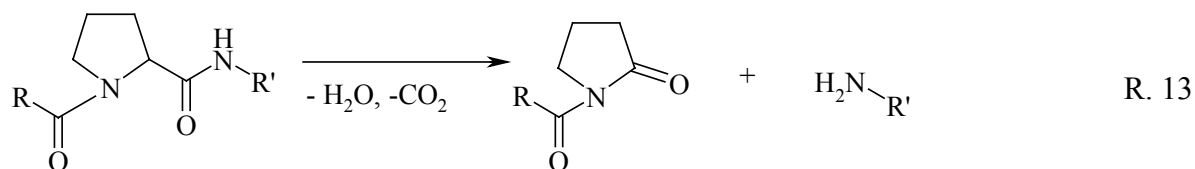
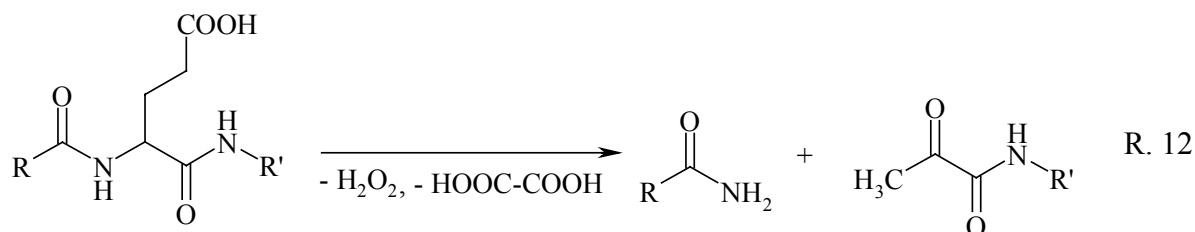
Abbildung 1.3.10: Reaktionsmöglichkeiten des Alkoxyradikals..

Durch den Angriff eines Hydroxylradikals an der Peptidkette kommt es also zur Quervernetzung, Hydroxylierung und Fragmentierung der Kette. Die durch Fragmentierung entstehenden  $\alpha$ -Ketoacyle **13** sind - zusammen mit anderen Carbonyl-Funktionen - Teil der durch Oxidativen Stress bedingten "Protein-Carbonylierung", deren Ausmaß eine Aussage über den Grad der Schädigung durch ROS zuläßt.

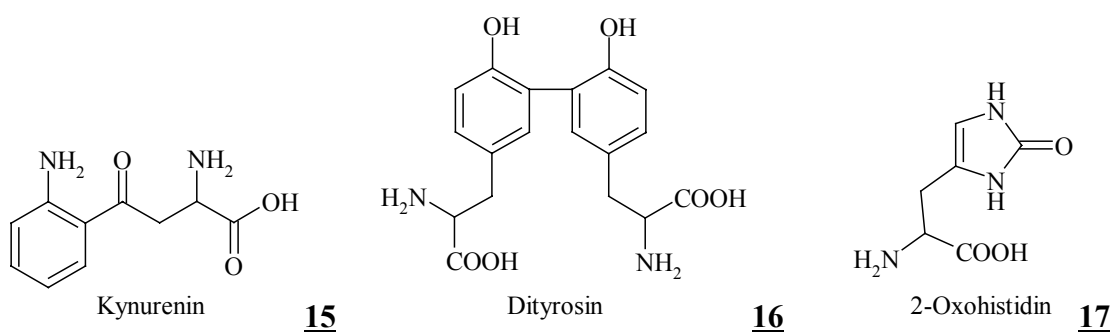
Eine Fragmentierung der Peptidkette kann auch durch die direkte Oxidation der Seitenketten der Aminosäurereste durch das Hydroxyl-Radikal (wobei es ebenfalls zur Bildung von Alkyl-Hydroxylen kommen kann) erfolgen.

<sup>21</sup> Die Reaktion des Isocyanats mit einer Hydroxylverbindung führt zu einem Alkyl-Urethan, mit einem Amin zu dem entsprechenden Alkyl-Harnstoff.

So führt die Oxidation von Glutaminsäure- (R. 12) oder Prolin-Seitenketten (R. 13) durch das OH-Radikal unter Bindungsbruch der Peptidkette zur Bildung eines N-Pyruvyl- bzw. 2-Pyrrolidon-Derivates (Berlett und Stadtman, 1997; Dean et al., 1997; Stadtman, 1993).



Die Reaktion des Hydroxyl-Radikals mit aromatischen Aminosäuren (Phe, Tyr, Trp und His) führt im Allgemeinen zu Hydroxylierungen des Aromaten. Tryptophan wird außerdem zu Formylkynurenin bzw. Kynurenin **15** oxidiert, mit Tyrosin kommt es zur Bildung von Dityrosin **16** und aus Histidin entsteht 2-Oxohistidin **17** (Lewisch und Levine, 1995; Uchida und Kawakishi, 1993).



Außer der durch Fragmentierung erfolgenden Bildung der  $\alpha$ -Ketoacyl-Derivate ( $\alpha$ -amidation pathway, Glutaryl-Seitenkettenoxidation) findet Carbonylierung auch durch direkte Oxidation der Seitenkette (Histidin) oder aber durch die Reaktion aktivierter Carbonyl-Derivate (Reaktionsprodukte der Lipoxidation und der Oxidation reduzierender Zucker) mit den Proteinen statt.

Tabelle 1.3.1: Direkte Oxidation der Seitenketten der Aminosäurereste in Peptiden und Proteinen durch OH-Radikale (ionisierende Strahlung).

Aminosäure-Rest	Oxidations-Produkt
Met	Methionin-Sulfoxid
Glu	N-Pyruvyl-Derivat (Fragmentierung)
Arg	Glutamin-Semialdehyd
Pro	Glutamin-Semialdehyd, 4-Hydroxyprolin, 2-Pyrrolidon (Fragmentierung)
Lys	2-Amino-Adipinsäure-Semialdehyd
Trp	N-Formylkynurenin, Kynurenin <b>15</b> , Monohydroxy-Derivate
His	2-Oxohistidin <b>17</b>
Tyr	3,4-Dihydroxyphenylalanin, Dityrosin <b>16</b>

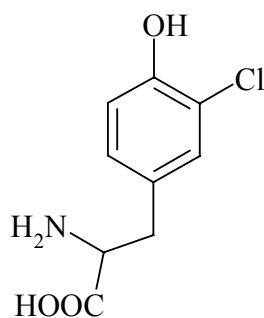
Da die Bildung des Hydroxylradikals unter physiologischen Bedingungen vor allem auf der Reaktion von Wasserstoffperoxid mit geeigneten reduzierenden Agenzien (z.B. Übergangsmetallionen) beruht<sup>22</sup>, entsteht dieses Radikal vor allem 'site specific', also an seinem Wirkungsort. Zu den bevorzugten Zielen zählen vor allem Histidin, Arginin, Lysin, Prolin sowie Methionin und Cystein, nicht aber Tryptophan, Tyrosin oder Phenylalanin (Stadtman, 1993).

### 1.3.2.2 Reaktionen der Hypochlorigen Säure

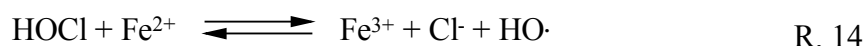
Die schwache Säure ( $pK_a = 7,5$ ) zeigt neben ihrer allgemein oxidierenden Wirkung ( $E^{\circ} = 1,1 \text{ V}$ )<sup>23</sup> besonders gegenüber (aktivierten) Aromaten eine große Reaktivität: die Reaktion mit Tyrosin führt zu unterschiedlichen Chloro-Derivaten, vor allem zu 3-Chlorotyrosin **18**.

<sup>22</sup> 'Metallkatalysierte Oxidation' (MCO)

<sup>23</sup> Durch das Gleichgewicht  $\text{HOCl} + \text{H}^+ + \text{Cl}^- = \text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O}$  kommt es zur Bildung von Chlor, das noch stärker oxidierend wirkt.

3-Chlorotyrosin **18**

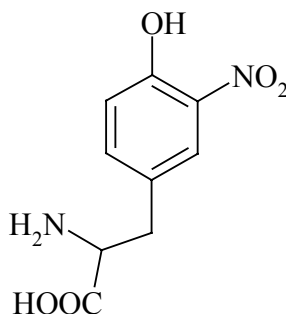
Durch die Addition an Doppelbindungen kommt es zu Bildung von Chlorhydrinen, die Reaktion mit primären Aminen führt zu Chloraminen. In Gegenwart geeigneter Elektronen-Donatoren kommt es zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen (R. 14).



Darüber hinaus ist Hypochlorige Säure in der Lage, Membranen zu durchqueren.<sup>24</sup>

### 1.3.2.3 Reaktionen der Peroxosalpetrigen Säure

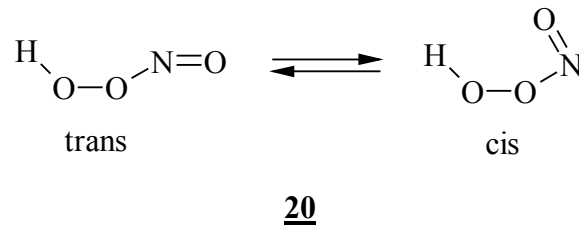
Die schwache Säure ( $\text{pK}_a = 6,8$ )<sup>25</sup> **20** weist eine stark oxidierenden Wirkung auf ( $E^\circ = 2,10$  V) und ist in der Lage, (aktivierte) Aromaten sowohl zu nitrieren als auch zu hydroxylieren. Bezüglich der Nitrierung kommt es aufgrund der gleichzeitig erfolgenden Deaktivierung des Aromaten ausschließlich zur Bildung von 3-Nitrotyrosin ( $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ ) **19**.

3-Nitrotyrosin **19**

<sup>24</sup> Auch  $\text{H}_2\text{O}_2$  sowie  $\text{HO}^2$  sind in der Lage, Membranen zu durchqueren.

<sup>25</sup> Je nach Autor liegt der Wert zwischen 5,1 und 7,0 ( $\text{pK}_a$  6,8 wurde in Phosphat-Puffer bestimmt).

Der genaue Mechanismus dieser Reaktionen ist noch nicht abschließend geklärt, Untersuchungen weisen aber darauf hin, daß nicht freie Radikale ( $\text{HO}^\cdot$  und  $\text{NO}_2^\cdot$ ), sondern vielmehr angeregte Zustände eine Rolle spielen, die - ohne physikalische Trennung - einer homolytischen ( $\text{HO}^\cdot/\text{NO}_2^\cdot$ ) oder aber einer heterolytischen ( $\text{HO}^-/\text{NO}_2^+$ ) Spaltung ähneln. So wird die oxidierende Wirkung einem schwingungsangeregten Zustand in trans-Konformation zugeschrieben („homolytische Spaltung“), die nitrierende Wirkung der cis-Konformation (**20**) (Übergangsmetall-katalysierte „heterolytische Spaltung“) (Beckman, 1996).



Auch die Peroxosalpetrige Säure ist in der Lage, Membranen zu durchqueren.

## 1.4 Aufgabenstellung

Wie oben dargestellt, reagieren die unterschiedlichen Körpergewebe auf einen Fremdkörper durch ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher immunologischer und reparativer Antworten. Handelt es sich bei diesem Fremdkörper um ein Implantat, so hängt das Ausmaß der Antwort entscheidend von dessen Oberflächeneigenschaften ab. Am günstigsten erweist sich eine bioaktive Oberfläche, die entweder intrinsische Eigenschaft des verwendeten Werkstoffes ist, oder aber durch entsprechende Modifizierung einer bioinerten Oberfläche erhalten werden kann.

Ein wichtiges Mittel zur Generierung einer bioaktiven Oberfläche ist die Anbindung physiologisch aktiver Proteine und Peptide: Zelladhäsionsproteine, adhäsionsvermittelnde Peptide, Wachstumsfaktoren oder Rezeptoren, die Zytokine binden können. In der vorliegenden Arbeit soll die Wirkung ‘Reaktiver Sauerstoff Spezies’, wie sie auch bei durch Implantation ausgelösten entzündlichen Reaktionen anzutreffen sind, auf an Festkörperoberflächen fixierte Proteine untersucht werden. Zu diesem Zweck wird

- die Anbindung von Modell-Proteinen an ausgewählte Biomaterialien
- die Simulation einer dem Entzündungsmilieu entsprechenden Umgebung *in vitro*
- die Analyse ausgewählter Marker oxidativer Veränderungen



eingehend betrachtet. Die detaillierte Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen der auftretenden Schädigung sowie ihr Einfluß auf die physiologische Aktivität der Proteine steht dabei im Hintergrund und bleibt der zukünftigen Untersuchung aktueller Fälle vorbehalten. Vielmehr soll ein methodisch übertragbares Modell bereitgestellt werden, daß im Labor grundlegend Aufschluß über Anbindung und Modifizierung infragekommender Proteine geben kann.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien für den Hartgewebekontakt

Die Titanlegierung TiAl6V4 und die Siliziumnitrid-Keramik  $\text{Si}_3\text{N}_4$  wurden uns von Herrn Dipl.-Ing. Kyeck, Lehr- und Forschungsgebiet Werkstoffwissenschaften, RWTH Aachen, bzw. Herrn Dipl.-Ing. Ragoss, Institut für Keramische Komponenten im Maschinenbau, RWTH Aachen, in Form kleiner Blöcke zur Verfügung gestellt. Die durch uns bestimmte, gemittelte Oberfläche der nicht ganz einheitlichen, rechteckigen Quader der Titanlegierung beträgt  $3,95 \text{ cm}^2$  insgesamt und  $1,17 \text{ cm}^2$  für eine der beiden größeren Flächen. Die Oberfläche der sehr einheitlichen, länglichen Quader der Siliziumnitrid-Keramik beträgt  $2,20 \text{ cm}^2$ . Ein Teil der Blöcke (sowohl Titanlegierung als auch Siliziumnitrid) lag poliert vor, der andere Teil war durch Sandstrahlung aufgeraut.

#### 2.1.1 Einführen von Aminogruppen auf Festkörperoberflächen

Zur Einführung von Amino-Gruppen auf der Materialoberfläche werden die Blöcke zuerst in einem Becherglas durch die Behandlung mit einer Mischung aus Wasserstoffperoxid 30% und konzentrierter Schwefelsäure im Verhältnis 1:1 oxidativ gereinigt (Nanci et al., 1998). Durch diese Prozedur verlieren die Titanlegierungs-Blöcke (mittleres Gewicht  $1,570 \text{ g}$ ) im Mittel jeweils  $41 \text{ mg}$  an Masse, d.i. 2,6%. Für die Oberfläche bedeutet dies einen Verlust von etwa 1,5 %.<sup>26</sup> Bei den chemisch sehr resistenten und auch weniger schweren (im Mittel  $0,69 \text{ g}$ ) Siliziumnitrid-Blöcken läßt sich kein Schwund feststellen. Nach Entnahme aus der oxidierenden Lösung werden die Blöcke ausgiebig mit deionisiertem Wasser gewaschen (säurefrei) und anschließend an der Luft getrocknet. Die trockenen Blöcke werden nun für vier Stunden unter Rückfluß in einer siedenden 0,43 M Lösung von 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) in Toluol behandelt (Nanci et al., 1998; Weetall, 1976) (Abbildung 2.1.1). Nach Entfernen der Heizquelle werden die Blöcke aus der abkühlenden Lösung entnommen, mit reichlich Toluol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet.

---

<sup>26</sup> Die Anfangs klare und farblose Lösung färbt sich zunehmend gelb, bis sie schließlich einen satten, orangegelben Farbton angenommen hat. Nach kurzer Zeit wird die noch immer klare Lösung schlagartig farblos, wenig später erfolgt ein Farbumschlag nach violett unter gleichzeitiger (metallischer) Eintrübung.

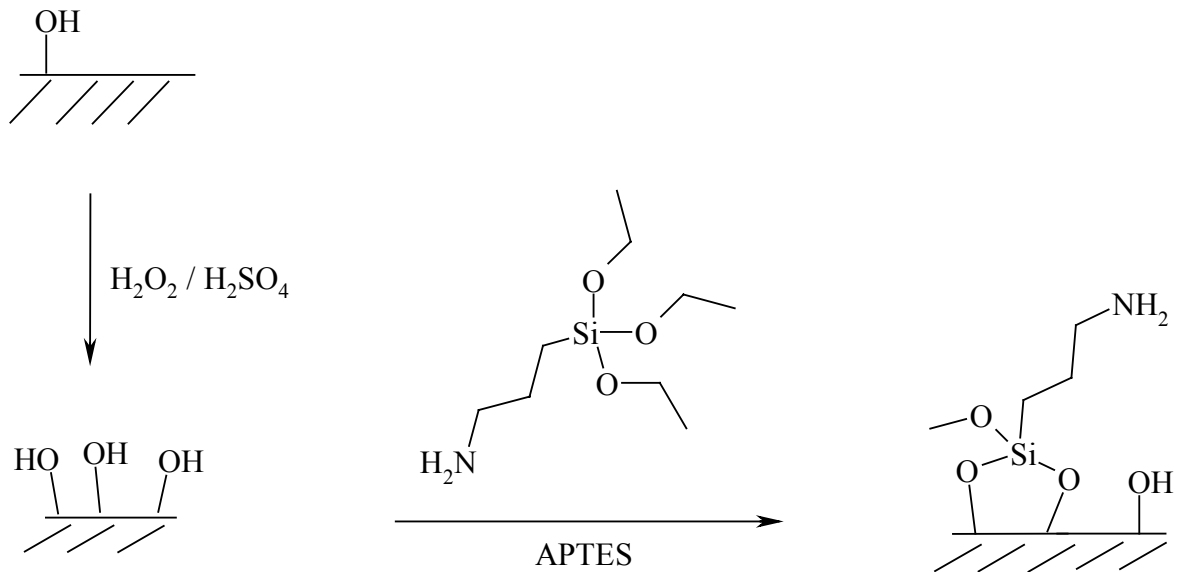


Abbildung 2.1.1: Reaktionsschema zur Einführung von Amino-Gruppen auf Materialien für den Hartgewebekontakt.

### 2.1.2 Anbindung von Proteinen an mit Aminogruppen funktionalisierte Festkörperoberflächen

Zur Anbindung von Proteinen/Peptiden an die mit APTES modifizierten Festkörperoberflächen werden die dort befindlichen Aminogruppen in einem ersten Schritt mit einem Dialdehyd zur Reaktion gebracht. Dazu werden die Blöcke für vier Stunden in eine 1%ige Glutaraldehyd-Lösung (GDA) in 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 gebracht (Nanci et al., 1998). Nach der Entnahme wird ausgiebig mit deionisiertem Wasser gewaschen und die Blöcke werden direkt im Anschluß für 14 h (ÜN) in eine Lösung des anzubindenden Proteins (0,1 mg/ml in PBS) gebracht (Abbildung 2.1.2). Der PBS-Puffer pH 7,2 (Phosphate Buffered Saline) setzt sich wie folgt zusammen:

NaCl	8,00 g/l	137 mM
KCl	0,20 g/l	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g/l	6,5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g/l	1,5 mM

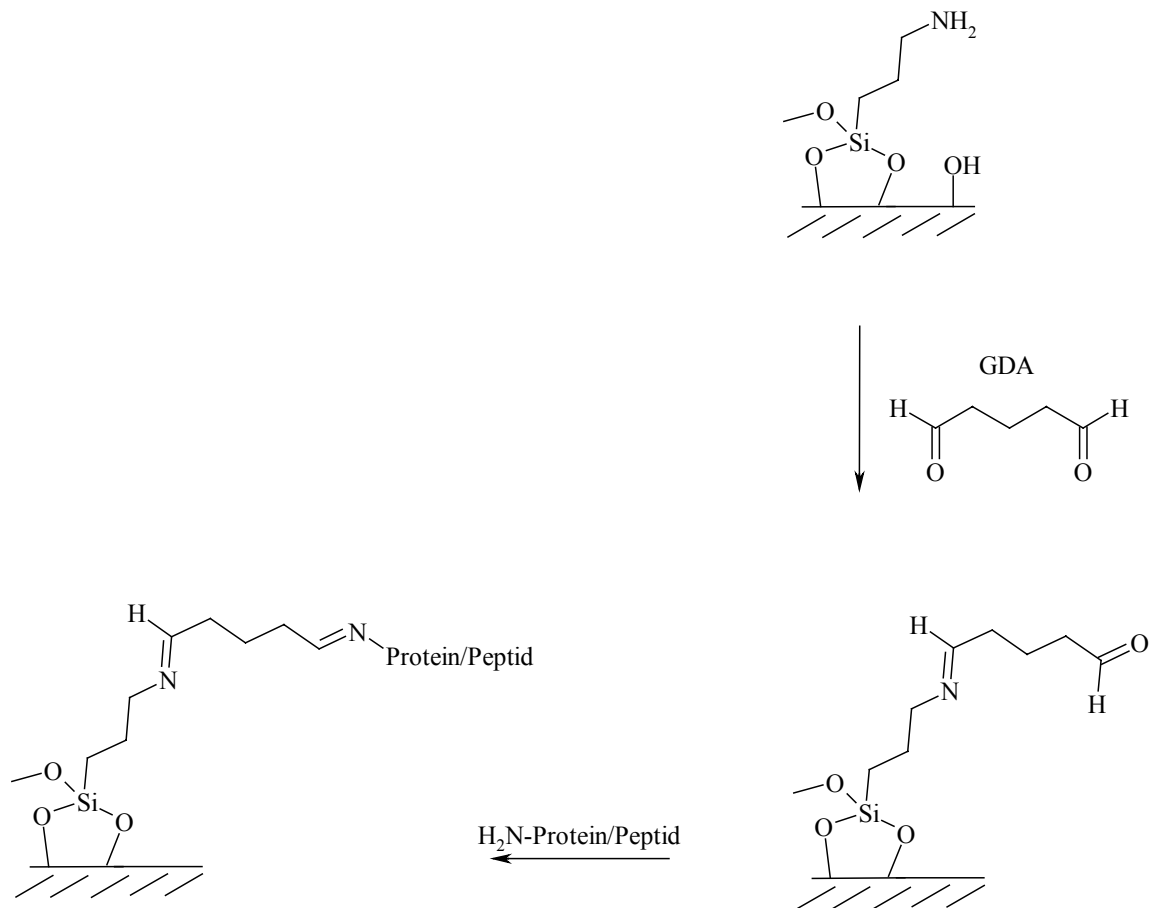


Abbildung 2.1.2: Anbindung von Proteinen an die aktivierte Festkörperoberfläche.

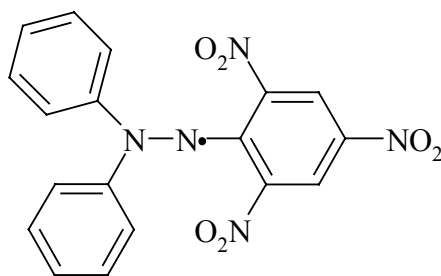
## 2.2 Materialien für den Weichgewebekontakt

Die degradierbaren Polymer-Folien (Poly-D,L-Lactid, PDLLA und das Pfropfcopolymer Poly-D,L-Lactid-co-Poly-Acrylsäure, PDLLA-AAc) wurden uns von Frau Dr. Klee, Deutsches Wollforschungsinstitut, RWTH Aachen, zur Verfügung gestellt.

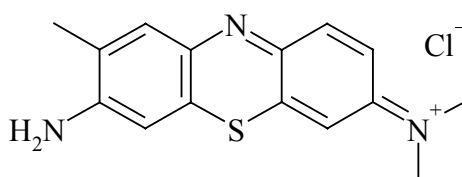
Zur Herstellung der Folien wird PDLLA in Chloroform (CH<sub>3</sub>Cl) gelöst (100 g/l) und in mit PTFE-beschichtete Kavitäten gegossen (0,25 ml/cm<sup>2</sup>). Nach 24 Stunden hat sich das Lösungsmittel verflüchtigt und die Folien werden zur Entfernung restlichen Lösungsmittels unter Vakuum gelagert (etwa 8 Stunden).

Zur Einführung von Carboxyl-Gruppen auf der Folienoberfläche werden die Polymer-Folien zuerst für 30 s mit einem Argon-Mikrowellenplasma (10<sup>-5</sup> mbar, 300 W) behandelt, wodurch sich nach anschließender Luftexposition reaktive Hydroperoxide (Peroxide) auf der

Oberfläche erzeugen lassen. Die durch das Argonplasma auf der Folienoberfläche erzeugten Hydroperoxide sind metastabil und können nach Photolyse oder Thermolyse (Peroxy-Radikale) als Initiatoren einer Pfropfcopolymerisation dienen. Ihre Zahl wurde mittels 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Hydrat (DPPH **21**) photometrisch zu  $8,7 (\pm 6,3) \cdot 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$  bestimmt (Thissen, 1999). Die große Schwankungsbreite läßt auf Inhomogenitäten innerhalb des Plasmas schließen.

DPPH **21**

Die Pfropfcopolymerisation mit Acrylsäure wird unter Stickstoff-Atmosphäre durchgeführt. Dazu werden die Folien mit einer wäßrigen Acrylsäurelösung (20% v/v) überschichtet und für 2,5 min mit einem Excimer der Wellenlänge 308 nm bestrahlt. Nach erfolgter Polymerisation der Acrylsäure werden die Folien ausgiebig mit Wasser gespült und anschließend im Vakuum getrocknet. Die Zahl der eingeführten Carboxylgruppen läßt sich mittels Toluidinblau O **22** zu  $1,3 - 7,7 (\pm 3) \cdot 10^{-8} \text{ mol/cm}^2$  bestimmen (Thissen, 1999; Völcker, 1999).

Toluidinblau O **22**

Dazu werden die Folien mit einer 0,5 mM Lösung von Toluidinblau in einer 0,1 mM Natronlauge für 5 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wird mehrmals mit einer 1 mM Natronlauge gewaschen. Nach Ablösen des ionisch gebundenen Farbstoffes durch Einwirken eines definierten Volumens einer 50% (v/v) Essigsäurelösung für 30 min bei Raumtemperatur kann die Konzentration des Farbstoffes im Photometer bei 633 nm bestimmt werden (Sano et al., 1993).

### 2.2.1 Anbindung von Proteinen an mit Carboxylgruppen funktionalisierte Festkörperoberflächen

Zur Anbindung der Proteine und Peptide an die mit Polyacrylsäure gepfropften Folien, werden in einem ersten Schritt die freien Carboxylgruppen der Polyacrylsäure-Schicht durch ihre Umwandlung in Succinimidyl-Ester aktiviert (Valuev et al., 1998) (Abbildung 2.2.1). Dazu werden 0,5 cm<sup>2</sup> Folie in 40 mM Natriumdihydrogenphosphat-Lösung pH 4,7 über Nacht (mindestens jedoch 2 h) vorgequollen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/Tween20 (0,05%) erfolgt die Aktivierung mit einer Mischung aus jeweils 1 ml wässriger Lösung von 400 mM 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 100 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS) für 30 Minuten bei 4°C. Es wird abermals zweifach mit PBS/Tween20 0,05%, anschließend mit 10 mM Acetat-Puffer pH 5,5 gewaschen. Das zu koppelnde Protein wird als Lösung (0,1 mg/ml) in 10 mM Acetat-Puffer pH 5,5 über Nacht mit den aktivierten Carboxylgruppen zur Reaktion gebracht (4°C). Nach Entfernen der Proteinlösung wird zweimal mit PBS/0,05% Tween20 gewaschen, abschließend noch einmal mit PBS. Für alle Schritte werden jeweils 2 ml Lösung verwendet.

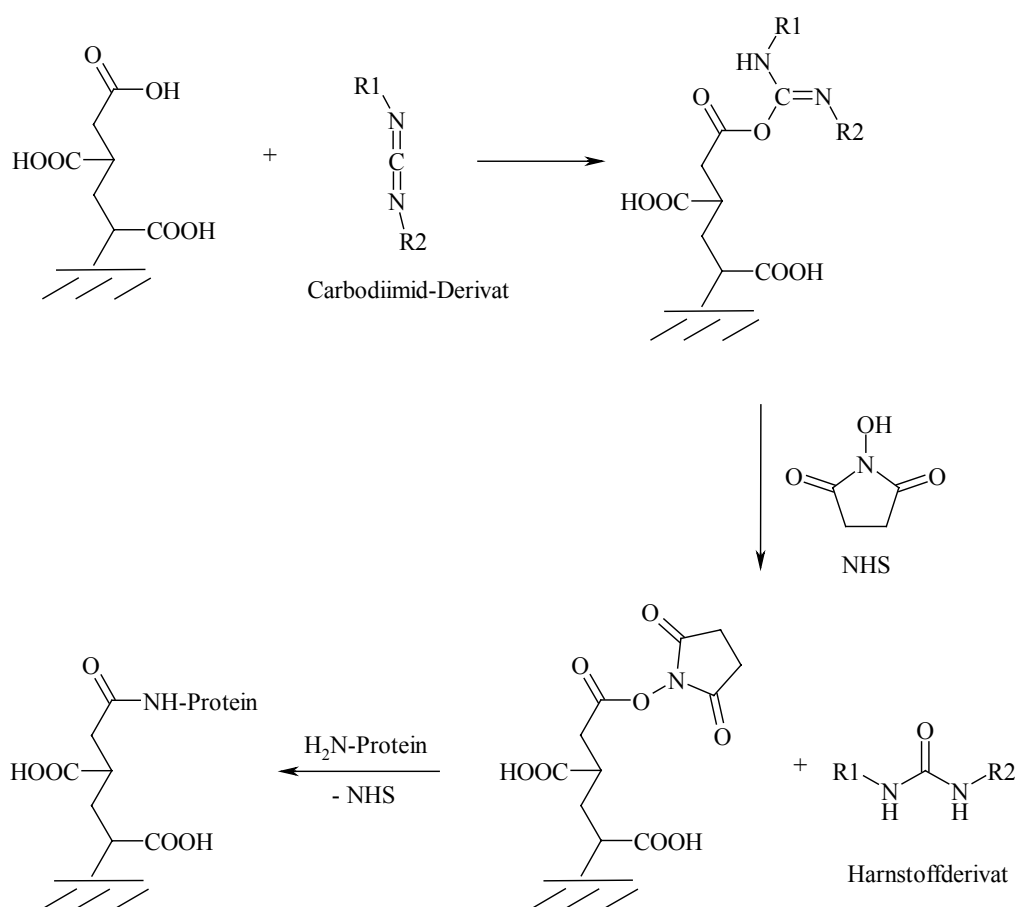


Abbildung 2.2.1: Reaktionsschema zur Aktivierung der Carboxylgruppen.

## 2.3 Meerrettich-Peroxidase als Modellprotein

Die Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase (HRP), EC 1.11.1.7, aus *Armoracia rusticana*) enthält 308 Aminosäurereste (siehe Anhang). Als Glykoprotein beträgt das Molekulargewicht etwa 44000 Da, das Molekulargewicht des reinen Proteinanteils beträgt 33918 Da. Der theoretische pI liegt bei 6,34. Das Protein ist als Enzym in der Lage, substratvermittelt mit verschiedenen Chromogenen unterschiedliche Farbreaktionen zu katalysieren. Dadurch eignet sich dieses Protein gut als auf den Oberflächen zu fixierendes Modellprotein, das bequem (semiquantitativ) nachgewiesen werden kann.

Die Meerrettichperoxidase katalysiert ganz allgemein die Reaktion



wobei  $\text{DH}_2$  für die reduzierte, D für die oxidierte Form eines Donors steht. Als Donor kommen beispielsweise Benzidin, besser aber Benzidin-Derivate (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, TMB)<sup>27</sup> in Frage. Durch eine Einelektronen-Oxidation entsteht daraus ein Kation-Radikal (blau), das bei Zugabe von ausreichend Säure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) durch ein weiteres Elektron vollständig oxidiert wird (gelb) (Abbildung 2.3.1) (Josephy et al., 1982).

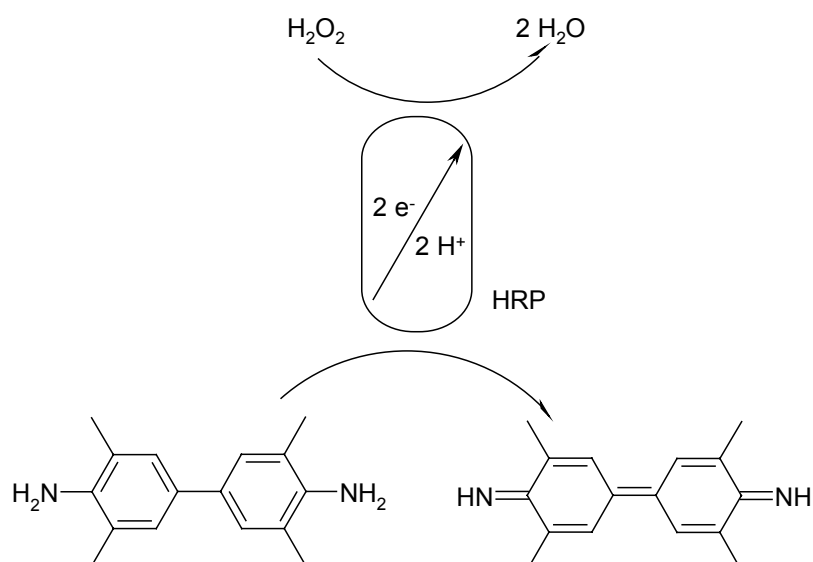


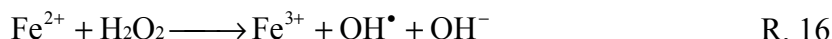
Abbildung 2.3.1: Reaktionsschema zur Umsetzung von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin durch HRP.

<sup>27</sup> TMB ist im Gegensatz zu Benzidin nicht kanzerogen (Bos et al., 1981).

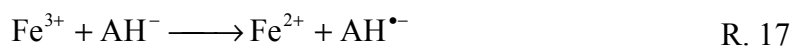
## 2.4 *in vitro*-Radikalsysteme

### 2.4.1 Fenton-System

Das Fenton-System dient der Erzeugung von Hydroxylradikalen *in situ*, die durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid zu einer Lösung eines Eisen(II)-Salzes erfolgt (R. 16).



In Anwesenheit eines Elektronen-Donors, beispielsweise Ascorbinsäure ( $\text{AH}^-$ ), wird die Reduktion von Eisen(III) zu Eisen(II) ermöglicht (R. 17), das dann wieder für die Zersetzung von Wasserstoffperoxid zur Verfügung steht.



### 2.4.2 Hypochlorige Säure (HOCl)

Die Hypochlorige Säure kann als Natriumhypochlorit-Lösung über den Handel bezogen werden. Mit einem pKa-Wert von 7,5 läßt sich die freie Säure aus der alkalischen Hypochlorit-Lösung durch einfaches Ansäuern gewinnen.

### 2.4.3 Peroxosalpetrige Säure (HOONO)

Zur Darstellung der Peroxosalpetrigen Säure (HOONO) werden unter Rühren 25 ml einer eisgekühlten wässrigen Lösung (Lösung 1), die Salzsäure (HCl, 0,7 M) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0,6 M) enthält, zu 25 ml einer eisgekühlten Natriumnitritlösung ( $\text{NaNO}_2$ , 0,6 M, Lösung 2) gegeben. Die entstehende Lösung (gelb) wird ohne Verzögerung möglichst rasch<sup>28</sup> und unter Rühren zu 75 ml einer ebenfalls eisgekühlten Natronlauge (NaOH, 1,2 M, Lösung 3) gegeben (Abbildung 2.4.1). Die so gewonnene, stark gelb gefärbte Lösung wird durch Ausfrieren bei  $-21^\circ\text{C}$  etwa drei Tage lang aufkonzentriert. Der tiefgelbe Überstand wird abgenommen, nach Bestimmung der Konzentration des Anions der

---

<sup>28</sup> Das beste Ergebnis wird erzielt, wenn das Gemisch aus HCl,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{NaNO}_2$  nach 1,5 sec in die Natronlauge gegeben wird. Dies ist manuell jedoch nicht zu erreichen [2,7 sec].



Peroxosalpetrigen Säure mit 0,6 N NaOH auf eine Konzentration von etwa 100 mM eingestellt und in kleinen Portionen (50-100  $\mu$ l) bei  $-21^{\circ}\text{C}$  zur Aufbewahrung eingefroren ( $\text{pH} > 12,5$ ). Die Konzentration der erhaltenen Peroxosalpetrigen Säure, die noch Spuren Wasserstoffperoxid enthält, kann photometrisch über den Molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{302} = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; Verdünnung 1:500 in 1N NaOH) bestimmt werden (Beckman, 1994). Die maximale durch uns erreichte Konzentration der so dargestellten Peroxosalpetrigen Säure belief sich auf 400 mmol/l (Ausbeute bezogen auf Natriumnitrit 4 mmol (27 Gew.%)).

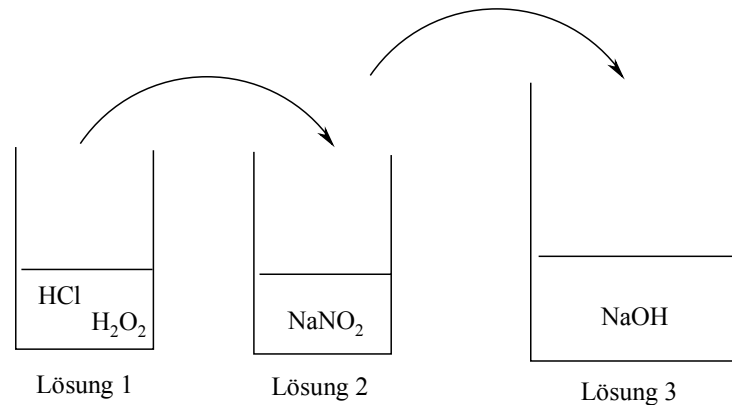


Abbildung 2.4.1: Darstellung der Peroxosalpetrigen Säure.

Zur Herstellung der Lösung 1 (0,7 M Salzsäure, 0,6 M Wasserstoffperoxid) werden 1,46 ml 12 N HCl und 1,53 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% auf 25 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gegeben; für Lösung 2 (0,6 M Natriumnitrit-Lösung) 1,04 g (15 mmol)  $\text{NaNO}_2$  auf 25 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und für Lösung 3 (1,2 M Natronlauge) 3,6 g (90 mmol) NaOH auf 75 ml  $\text{H}_2\text{O}$ .

## 2.5 Protein-Nitrierung

Zur Nitrierung der Proteine (Tyrosyl-Reste) mit Peroxosalpetriger Säure werden Rinderserumalbumin (BSA), Meerrettich Peroxidase (HRP) sowie  $\beta$ -Lactoglobulin in einer Konzentration von 1 bzw. 10 mg/ml in 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,4 gelöst. Zu einem Milliliter dieser Lösung werden 1 ml 100 mM Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 4,7 sowie unter kräftigem Rühren 5 - 40  $\mu$ l Peroxosalpetrige Säure ( $\text{HOONO}$ ) (100 mM) zugegeben. Nach 15 min Reaktionszeit werden die Reagenzien und das Protein durch Ultrafiltration (Centricon YM-10; *Millipore, Bedford (USA)*) voneinander getrennt, der Überstand wird mit 1 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 aufgenommen.

## 2.6 Analytik

### 2.6.1 Bestimmung der Zahl der Amino-Gruppen auf Festkörperoberflächen

#### 2.6.1.1 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)

Die Anzahl der auf der Festkörperoberfläche eingeführten Aminogruppen kann indirekt photometrisch bestimmt werden. Dazu wird der Festkörper mit einer 0,1%igen TNBS-Lösung (2 ml) in 3%igem Natrium-Boratpuffer pH 9,5 für 5 Minuten bei 70°C zur Reaktion gebracht (Habeeb, 1965; Puleo, 1997). Anschließend wird ausgiebig mit Wasser und Boratpuffer gewaschen. Zur Freisetzung des nachzuweisenden Pikrat-Anions wird wieder bei 70°C, diesmal allerdings in einem definierten Volumen (2 ml) 1 N NaOH für 10 Minuten erwärmt (Abbildung 2.6.1). Die Absorption der so entstehenden Lösung des farbigen Pikrat-Anions (orange bis rostrot) wird bei 410 nm UV/VIS-photospektrometrisch bestimmt. Die Konzentration kann über eine zuvor erstellte Kalibrierfunktion ermittelt werden.

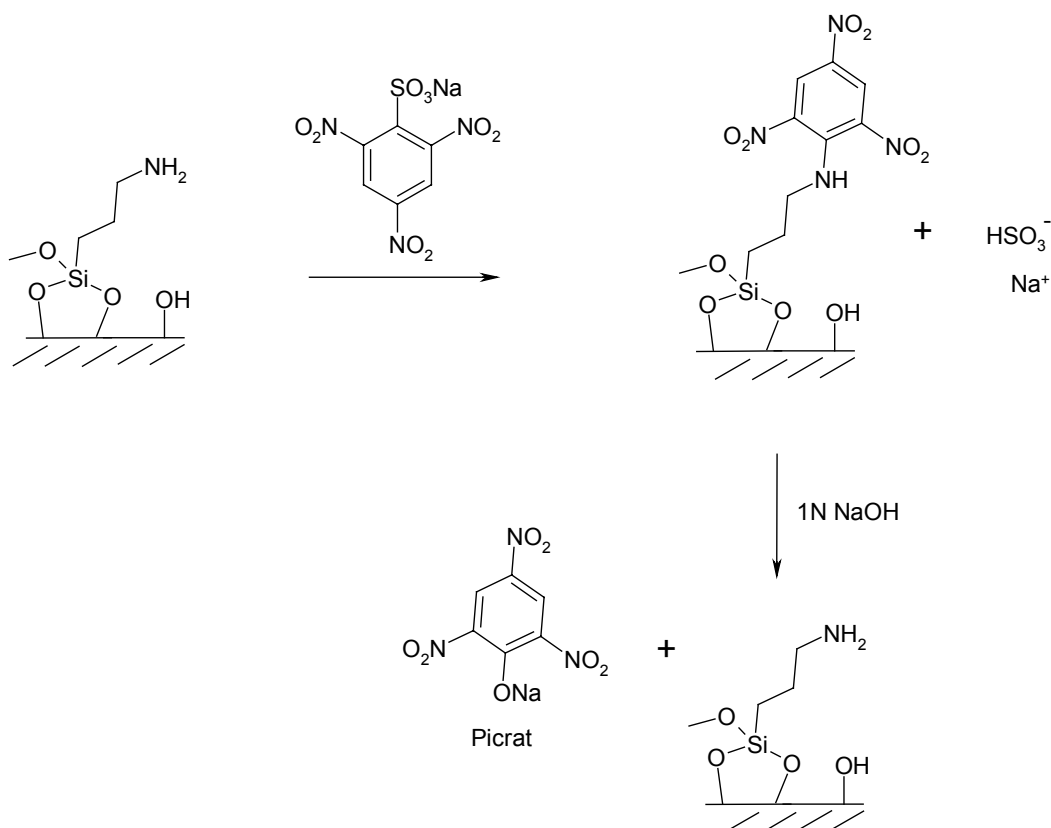


Abbildung 2.6.1: Reaktionsschema zur Bestimmung der Zahl der Amino-Gruppen auf der Festkörperoberfläche mit TNBS.

Zur Herstellung der 0.1% TNBS Reaktionslösung (150 mM) in 3% Na-Borat-Puffer (3 g auf 100 ml H<sub>2</sub>O), werden 50 µl der 5%igen TNBS-Lösung auf 2500 µl Boratpuffer gegeben (Verdünnung 1:50). Der Extinktionskoeffizient wurde (Kiranias, 1997 und Komsa-Penkova, 1997) entnommen.

#### 2.6.1.2 *s*-Succinimidyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat (*s*SDTB)

Ein weiteres Reagenz, das einen noch empfindlicheren Nachweis der auf der Oberfläche befindlichen Amino-Gruppen erlaubt, ist *s*-Succinimidyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat (*s*SDTB). Für die indirekte photometrische Bestimmung wird der Festkörper bei Raumtemperatur (RT) für 30 Minuten in einer Lösung von 0,1 mM *s*SDTB in 50 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 8,5 behandelt. Nach der Reaktion wird ausgiebig mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen und das farbige Nachweismolekül (4,4'-Dimethoxytrityl-Kation) mit 37%iger Perchlorsäure freigesetzt (Abbildung 2.6.2).

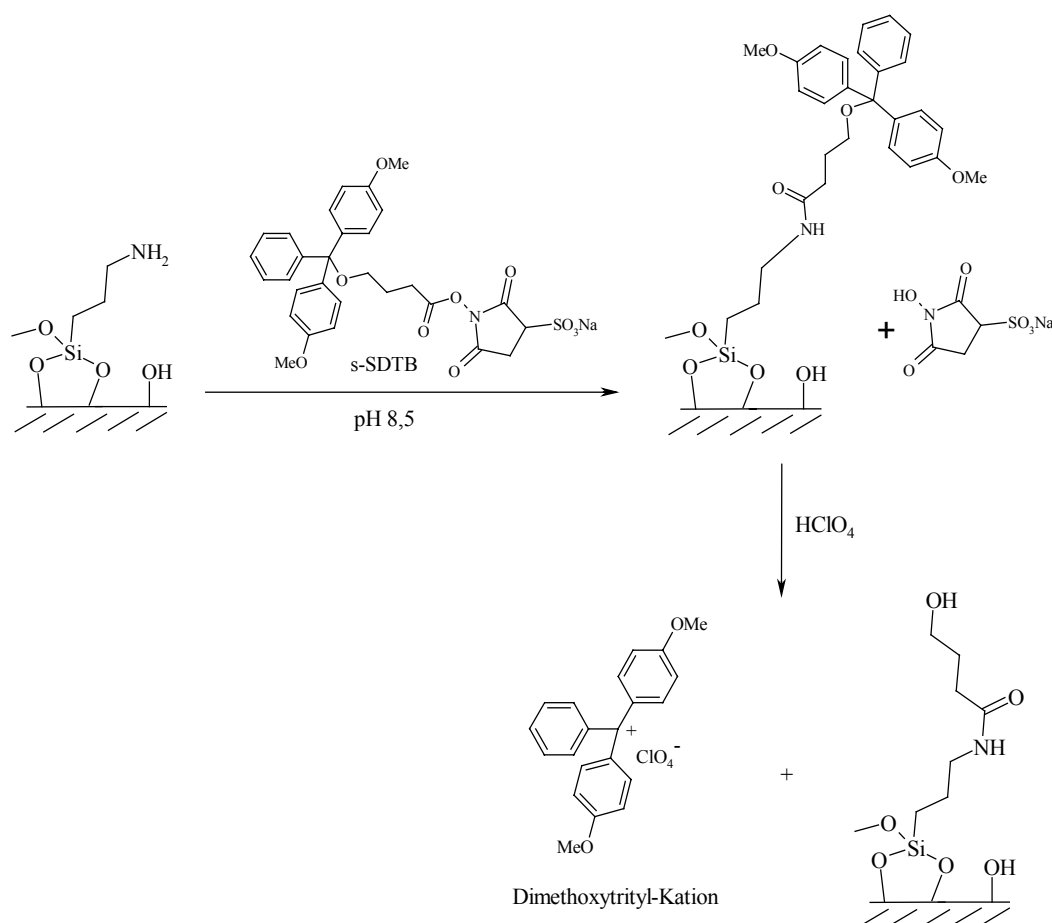


Abbildung 2.6.2: Reaktionsschema zur Bestimmung der Zahl der Amino-Gruppen auf der Festkörperoberfläche mit *s*SDTB.

Zur Herstellung der 0,1 mM sSDTB-Reaktionslösung werden 3 mg (5  $\mu\text{mol}$ ) sSDTB in 1 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst und anschließend mit einer 50 mM Natriumhydrogencarbonat-Lösung (420 mg/ 100 ml pH 8,5 (NaOH)) auf 50 ml aufgefüllt.

Die Konzentration des Dimethoxytrityl-Kations kann über eine zuvor erstellte Kalibrierfunktion oder aber über den Molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{498} = 70000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) bei einer Wellenlänge von 498 nm ermittelt werden (Cook et al., 1997; Gaur und Gupta, 1989).

### 2.6.2 Aminosäureanalyse von an PDLLA-AAc gebundenen Proteinen und Peptiden

Sowohl die Menge als auch die Art der an die Folienabschnitte (PDLLA, PDLLA-AAc) gebundenen Proteine kann über eine Aminosäureanalyse bestimmt werden. Dazu werden die 0,5  $\text{cm}^2$  großen Folienabschnitte in einem Hydrolysevial zusammen mit 500  $\mu\text{l}$  6 N HCl für 20 h auf 108°C erhitzt. Nach erfolgter Hydrolyse werden die Proben unter Vakuum bis zur Trockene eingengt (wobei manchmal ein viskoser Rückstand beobachtet werden kann). Das Hydrolysat wird in 200  $\mu\text{l}$  Startpuffer aufgenommen, wovon die Hälfte (100  $\mu\text{l}$ ) zur Analyse auf einem Biotronik Aminosäure Analysator LC 5001 verwendet wird: die unterschiedlichen Aminosäuren werden über einen Kationentauscher getrennt und anschließend mit o-Phthaldialdehyd (OPA) derivatisiert (Nachsäulen-Derivatisierung), so daß eine fluorometrische Detektion erfolgen kann (Abbildung 2.6.3).

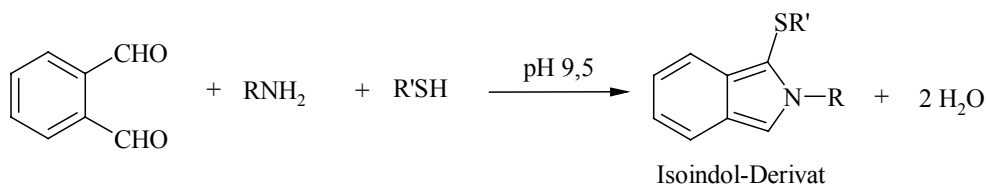


Abbildung 2.6.3: Reaktionsschema der Nachsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd.

### 2.6.3 Photometrische Bestimmung der Menge gebundener Meerrettichperoxidase

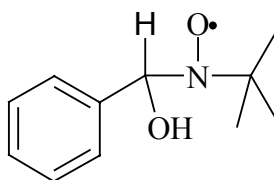
Zur Bestimmung der Menge gebundenen Proteins wird im Falle der Titanlegierung der zu untersuchende Festkörper in 10 ml Chromogen-Lösung gebracht (10 ml Acetat-Puffer 10 mM pH 5,5/ 100  $\mu\text{l}$  einer Lösung von 10 mg/ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in Dimethylsulfoxid (DMSO)/ 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3 %). Nach 15 min wird 1 ml der Reaktionslösung abgenommen und mit 1 ml 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt.

Zur Untersuchung der Folienabschnitte werden diese in 1 ml Chromogen-Lösung (s.o.) gegeben. Nach 15 min wird die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt.

Die jeweilige Farbstoff-Konzentration wird photometrisch bei 450 nm bestimmt, über eine zuvor erstellte Kalibrierfunktion kann daraus die zugehörige Menge HRP erhalten werden (Cattaneo und Luong, 1994; Garner, 1975; Josephy et al., 1982; Welinder, 1976).

#### 2.6.4 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)

Die über das Fenton-System erzeugten Hydroxyl-Radikale können mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) nachgewiesen werden. Wegen der kleinen Halbwertszeit der Hydroxyl-Radikale (ca. 10<sup>-9</sup> s) werden diese zur Analyse durch die Bildung eines Spinadduktes **23** (spin trapping) stabilisiert. Als Spin-Trap wird N-tert-Butyl- $\alpha$ -Phenylnitron (PBN) verwendet.



Spinaddukt PBN mit OH-Radikal **23**

Die ESR-Spektren wurden durch Herrn Dr. Mihelcic, Institut für Chemie der Belasteten Atmosphäre, ICG-2, Forschungszentrum Jülich, auf einem Bruker ESP 300 E Spektrometer aufgenommen. Die Proben wurden in selbstgezogenen Quarzkapillaren ( $\phi_a$  2,5 mm/ $\phi_i$  1,5 mm) analysiert. Geräteparameter: X-Band, sweep width 60 G (sweep time 83,886 s), number of scans 4, center magnetic field 3452,50 G. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Das Absorptionssignal wird in Form seiner 1. Ableitung aufgezeichnet, die zugehörige Intensität  $I$  wird daraus durch zweimalige Integration erhalten. Damit ein direkter Vergleich der aus verschiedenen Spektren stammenden Intensitäten möglich wird, müssen diese normiert werden:

$$I^N = \frac{I}{Q} \cdot F_{\text{exp}} \cdot P_{\text{RF}} \cdot A_M \quad \text{Gl. 1}$$

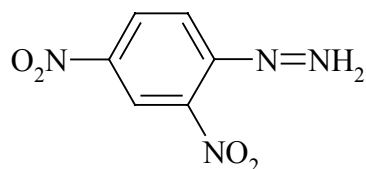
Q	Resonator Güte
F <sub>exp</sub>	Verstärkungsfaktor (receiver gain)
P <sub>RF</sub>	SQR [Mikrowellen Leistung]
A <sub>M</sub>	Modulationsamplitude

Um exemplarisch die Hydroxylradikal-Bildung durch ein Fenton-System nachzuweisen, wird zu einem Milliliter einer wäßrigen 0,4 mM Lösung (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ein Milliliter einer wäßrigen 1,2 M Lösung Wasserstoffperoxid, 1 ml einer 0,66 mM PBN Lösung in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 sowie außerdem 1 ml dieses Puffers zugegeben, so daß folgende Endkonzentrationen vorliegen: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0,1 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 mM und PBN 0,165 mM. Nach etwa 1 min Reaktionszeit werden die Proben im Spektrometer analysiert.

Zur Bestimmung der Anzahl der durch das gewählte Fenton-System erzeugten Hydroxyl-Radikale bzw. der daraus entstandenen PBN-OH-Moleküle wird mit Hilfe von DPPH **21** eine Kalibrierfunktion ermittelt. Dazu wird DPPH in drei unterschiedlichen Konzentrationen (10, 100 und 1000 nmol/ml) in einer Mischung aus Toluol und Methanol (70:30 v/v) gelöst und anschließend im Spektrometer analysiert (Ma et al., 1999).

### 2.6.5 Carbonylierungs-Experimente

Die oxidierende Wirkung sowohl der Hydroxylradikale als auch der Peroxosalpetrigen Säure kann durch einen Carbonylierungs-Test qualitativ bestimmt und verglichen werden (Levine et al., 1994): durch Umsetzen der in den Proteinen vorhandenen Carbonyl-Reste mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH **24**) erhält man farbige Hydrazone, die photometrisch bestimmt werden können.



DNPH **24**

Das Fenton System: in 2 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 werden 10 mg Rinderserumalbumin (BSA) (152 nmol; 76 µM) gelöst. Zu diesen 2 ml werden 1 ml Fe(II)-

EDTA-Lösung (10 mM) sowie 10, 100 oder 1000  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  pH 7,2 (100 mM) und eventuell Pufferlösung gegeben, so daß das Endvolumen immer 4 ml beträgt. Nach 20 Minuten werden daraus 2 ml abgenommen und das Protein von den Reagenzien durch Ultrafiltration (Centricon YM-10, *Millipore*) getrennt. Der Überstand wird in 250  $\mu\text{l}$  Pufferlösung aufgenommen, dazu kommen 250  $\mu\text{l}$  12% SDS-Lösung und 500  $\mu\text{l}$  der DNPH-Reaktionslösung (20 mM). Nach 20 min Reaktionszeit werden schließlich 350  $\mu\text{l}$  2M Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) zur Neutralisation zugegeben (Visser und Winterbourn, 1991a; Visser und Winterbourn, 1991b).

1 ml dieser Lösung wird auf einer BioSys2000 (*Beckman Coulter*) isokratisch mit 200 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,3 1%SDS und einem Fluß von 1 ml/min über eine Gelfiltrationssäule (Bio-Select SEC 250-5, *Bio-Rad*) getrennt, die Detektion erfolgt bei 280nm und 360 nm.

Das Peroxosalpetrige Säure-System: 20 mg Rinderserumalbumin (300 nmol) werden in 2 ml 200 mM Natriumdihydrogenphosphat-Lösung pH 4,7 gelöst. Unter Rühren werden 5 - 40  $\mu\text{l}$  Peroxosalpetrige Säure (200 mM) zugegeben. Nach 15 min werden aus dieser Lösung 250  $\mu\text{l}$  abgenommen, dazu kommen 250  $\mu\text{l}$  12% SDS Lösung und 500  $\mu\text{l}$  der DNPH-Reaktionslösung. Nach 20 min werden schließlich 350  $\mu\text{l}$  2M Tris zur Neutralisation zugegeben. Bei der isokratischen Trennung des Reaktionsgemisches über eine Gelfiltrationssäule (Bio-Gel P6, *Bio-Rad*) mit 200 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,3 1% SDS und einem Fluß von 1 ml/min lassen sich drei Banden beobachten (gelb, orange-gelb und orange-braun). Die zuerst eluierte Bande (gelb) enthält das derivatisierte Protein und wird nach einer Verdünnung 1:10 mit  $\text{H}_2\text{O}$  bei 280 nm und 360 nm analysiert (Lambda 5 UV-VIS Spectrophotometer, *Perkin Elmer*).

Zur Herstellung der Fe(II)-EDTA-Lösung werden 27,8 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  und 55,8 mg Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA) in 10 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2 gelöst, so daß eine 10 mM bzw. 15 mM Lösung entsteht.

Zur Herstellung der 0,3% Wasserstoffperoxidlösung (100 mM) werden 100  $\mu\text{l}$  Wasserstoffperoxid 30% auf 10 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2 gegeben.

Zur Herstellung der 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reaktionslösung werden 396 mg DNPH in 10 ml TFA gelöst und anschließend mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 ml aufgefüllt (20 mM). Der pH-Wert dieser Lösung wird mit 1 N NaOH auf pH 0,3 angehoben. Der Molare Extinktionskoeffizient für DNPH ist  $\epsilon_{370} = 22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 2.6.6 Photometrische Bestimmung von 3-Nitrotyrosin-Gruppen in Proteinen

Zur direkten photometrischen Bestimmung der 3-Nitrotyrosingruppen bei 438 nm werden aus den Lösungen der mit HOONO umgesetzten Proteine 100 µl entnommen und mit 50 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung pH 9 auf 1 ml aufgefüllt (Verdünnung 1:10). Die Konzentration wird über den Molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon = 4300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (pH 9) bestimmt (Constantin-Teodosiu et al., 1995; Khan et al., 1998).

### 2.6.7 Flüssigkeitschromatographie

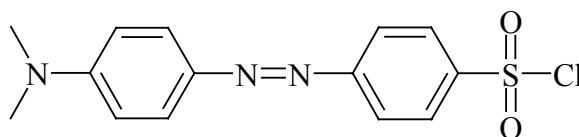
Die chlorierende Wirkung (auf aktivierte Aromaten) der im Handel als Natriumhypochlorit-Lösung erhältlichen Hypochlorigen Säure wird überprüft, indem zu 10 ml einer wäßrigen 3 mM Lösung Tyrosin (30 µmol) 100 µl einer 1 M NaOCl-Lösung (100 µmol) zugegeben werden. Nach Einstellen des pH-Wertes auf pH 2, 5 oder 7,4 und 20 min Reaktionszeit wird das Reaktionsgemisch (Inj. 200 µl, entsprechend 600 nmol Tyr) auf einer BioSys2000 (*Beckman Coulter*) isokratisch (Elutionspuffer: 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 3,5/Methanol 70/30 (v/v)) und mit einem Fluß von 1 ml/min über eine RP18-Säule (Lichrospher 100 RP18-5 EC, *Merck*) analysiert und bei 280 nm detektiert. Werden außerdem vor Zugabe der Natriumhypochlorit-Lösung noch 30 µmol  $\text{NaNO}_2$  zur Reaktionslösung dazugegeben (3 mM in 10 ml), so läßt sich analog der oben beschriebenen Vorgehensweise auch die nitrierende Wirkung des aus HOCl und  $\text{NO}_2^-$  gebildeten Nitrylchlorids überprüfen.

Die nitrierende Wirkung der im Labor hergestellten Peroxosalpetrigen Säure auf aktivierte Aromaten wird überprüft, indem zu 10 ml einer 3 mM Lösung Tyrosin (30 µmol) in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 4,7 40 µl einer 400 mM  $\text{ONOO}^-$ -Lösung (16 µmol, Endkonzentration 1,6 mM) zugegeben werden. Nach 15 min Reaktionszeit wird das Reaktionsgemisch (Inj. 200 µl entsprechend 600 nmol Tyr) auf einer BioSys2000 (*Beckman Coulter*) isokratisch (Elutionspuffer 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 3,5/Methanol 70/30 (v/v)) und mit einem Fluß von 1 ml/min über eine RP18-Säule (Lichrospher 100 RP18-5 EC, *Merck*) analysiert (Detektion bei 280 nm).



### 2.6.8 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie - HPLC

Zur Untersuchung der Proteine auf ihren 3-Nitrotyrosin Gehalt, werden diese in einem ersten Schritt hydrolysiert. Dazu werden 10 µg Protein in einem Hydrolysevial zusammen mit 500 µl 6 N HCl für 90 min auf 150°C erhitzt. Nach erfolgter Hydrolyse werden die Proben unter Vakuum bis zur Trockene eingengt. Das Hydrolysat wird zur Vorsäulenderivatisierung in 100 µl NaHCO<sub>3</sub> 50 mM pH 8,5 aufgenommen. Nach Zugabe von 100 µl 4-Dimethylaminoazobenzol-4'-sulfonyl-chlorid (DABS-Cl **25**) 4 mM (400 nmol) in Acetonitril wird für 10 min bei 70°C in einem Wasserbad erwärmt (Farbumschlag rot nach orange). Anschließend werden 800 µl Natriumphosphatpuffer 50 mM pH 6,8/Ethanol (1:1 (v/v)) zugeben, so daß das Endvolumen 1 ml beträgt.



DABS-Cl **25**

Zur Untersuchung des Aminosäure-Standards (*Pierce*; 2,5 nmol/µl je Aminosäure in 0,1 M HCl) werden 5 µl (je 12,5 nmol) in der Speedvac bis zur Trockene eingengt und anschließend in 100 µl NaHCO<sub>3</sub> 50 mM pH 8,5 aufgenommen. Nach Zugabe von 100 µl DABS-Cl 4 mM (400 nmol) in Acetonitril wird für 10 min bei 70°C im Wasserbad erwärmt, wobei ein Farbumschlag von rot nach orange zu beobachten ist. Anschließend werden 800 µl Natriumphosphatpuffer 50 mM pH 6,8/Ethanol (1:1 v/v) zugeben, so daß das Endvolumen 1 ml beträgt (*Knecht und Chang, 1986; Malencik et al., 1998; Stocchi et al., 1998*).

Aus den so erhaltenen Lösungen werden jeweils 20 µl mittels HPLC unter Verwendung eines Gradientensystems analysiert (*Hewlett&Packard*; HP 1050 System mit Diodenarray):

Trennsäule:	LiChroCart 250-4, Supersphere 100 Å, RP-18e ( <i>Merck</i> )		
Säulentemperatur:	40°C;	Fluß: 0,7 ml/min;	Detektion: 436 nm
Laufmittel:	A) 20 mM NaHCO <sub>3</sub> , pH 8,1; 4% DMF (v/v)		
	B) 90% Acetonitril; 10 % Isopropanol (v/v)		

Gradient:

t [min]	% B
0	22
5	22
11	28
16	28
26	40
31	40
61	60
71	100
76	100
80	22

Zur Herstellung der 4 mM 4-Dimethylaminoazobenzol-4'-sulfonylchlorid (DABS-Cl) Lösung werden 1,3 mg DABS-Cl (4  $\mu$ mol) in einem Milliliter Acetonitril gelöst.

Zur gemeinsamen Untersuchung der Aminosäurederivate wird der Aminosäurestandard H (*Pierce*) verwendet (Zusammensetzung: je 2,5  $\mu$ mol/ml Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val und  $\text{NH}_3$  in 0,1 N HCl sowie Cys<sub>2</sub>, das in einer Konzentration von 1,25 nmo/ $\mu$ l vorliegt). Zur Vorsäulenderivatisierung werden jeweils 5  $\mu$ l Standard eingesetzt, entsprechend 12,5 nmol je AS. Bei einem Injektionsvolumen von 20  $\mu$ l werden so 250 pmol je Aminosäure appliziert.

Zum Nachweis einzelner Aminosäuren werden diese in einer Konzentration von 2,5  $\mu$ mol/ml in 0,1 N HCl eingewogen. Bis auf die Aminosäuren Phe, Tyr, Met, und His (*Sigma*) wurden Aminosäuren von *Serva* verwendet.

### 2.6.9 Immunologische Nachweismethoden – ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay)

Zum immunologischen Nachweis von 3-Nitrotyrosyl-Resten in Proteinen wird der Analyt (das zu untersuchende Protein) zur Adsorption über Nacht bei RT in eine 96Well-Platte (*NUNC*; Immunoplate Maxisorp F96) gegeben (50  $\mu$ l Proteinlösung 0,1 - 1 mg/ml + 50  $\mu$ l PBS). Nach Entfernen der Analyt-Lösung wird 3fach mit jeweils 200  $\mu$ l einer PBS/Tween20 (0,05%)-Lösung pH 7,2 gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Adsorption des primären Antikörpers wird anschließend für 2 h bei RT mit jeweils 100  $\mu$ l PBS/MLK 2% (entrahmte Trockenmilch; *Glücksklee*) geblockt. Der Block wird entfernt und es wird 3fach mit PBS/Tween20 (0,05%) pH 7.2 gewaschen. Nun wird der Primärantikörper (AK1) (100  $\mu$ l)

zugegeben und für 2 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach Entfernen des AK1 wird mit 3 x PBS/Tween20 (0,05%) gewaschen. Dann wird der Sekundär-Antikörper (AK2, 100 µl) für ½ h bei RT zugegeben. Nach Entfernen wird 3fach mit PBS/Tween20 (0,05%) gewaschen. Zwischen den einzelnen Schritten werden die Well-Platten mit einem Plate Sealer (*Costar*) verschlossen. Durch Zugabe von 100 µl Detektions-Reagenz wird eine Farbreaktion gestartet, die nach 15 min mit 100 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M gestoppt wird. Das Ergebnis wird photometrisch mit einem 'Wellplatten-Reader' bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.

Zur Herstellung der Chromogen-Lösung (Detektions-Reagenz) werden zu 10 ml Natriumacetat-Puffer pH 5,5 (10 mM) 100 µl einer 24 M Lösung 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in Dimethylsulfoxid (DMSO; 10 mg/ml) sowie 100 µl einer 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (100 mM) gegeben.

Primär-Antikörper (AK1): Verdünnung 1/1000 in PBS/ BSA (0,2%)

Kaninchen Anti-Nitrotyrosin IgG, polyklonal (*Upstate Biotechnology*)

Sekundär-Antikörper (AK2): Verdünnung 1/2000 in PBS/ BSA(0.2%)

Ziege Anti-Kaninchen IgG - HRP\* (*DACO*)

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Immobilisierung von Proteinen an Materialien für den Hartgewebekontakt

Für die Experimente zur Anbindung von Proteinen an Materialien für den Hartgewebekontakt werden die Legierung TiAl6V4 sowie die Keramik  $\text{Si}_3\text{N}_4$  in Form polierter oder durch Sandstrahlung mattierter Blöcke verwendet. Allgemein liegen Metalle und Metalllegierungen, die der umgebenden Atmosphäre ausgesetzt sind, an der Oberfläche oxidiert vor und werden in Gegenwart von Luftfeuchtigkeit hydratisiert. Sowohl die Legierung als auch die Keramik weisen also eine Oxidschicht auf, die sich auf molekularer Ebene als OH-Funktionalität präsentiert.<sup>29</sup> Diese Oxidschicht kann - unter gleichzeitiger Abtragung der obersten Schichten und somit eventueller Verunreinigungen - gezielt über eine oxidative Behandlung mit einer Mischung aus Wasserstoffperoxid und konzentrierter Schwefelsäure "aktiviert" und in ausreichender Schichtdicke erhalten werden.

Zur kovalenten Anbindung von Proteinen oder Peptiden an die so behandelten Substratoberflächen stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung, wobei besonders den Hydroxylgruppen die Rolle der aktiven Gruppe auf Substratseite zukommt. Eine einfach zu handhabende Methode ist die Einführung einer geeigneten funktionellen Gruppe über Silan-Anbindung unter Verwendung eines heterofunktionellen Reagenzes. Für Aminogruppen eignet sich hierfür u.a.  $\gamma$ -Aminopropyl-Triethoxysilan (APTES), das z.B. durch Erhitzen in Toluol an das Substrat gebunden werden kann (siehe Abbildung 2.1.1). Zur Anbindung der Proteine oder Peptide können die Aminogruppen anschließend mit beispielsweise Glutardialdehyd (GDA) aktiviert werden (Abbildung 3.1.1; s. a. Abb. 2.1.2).

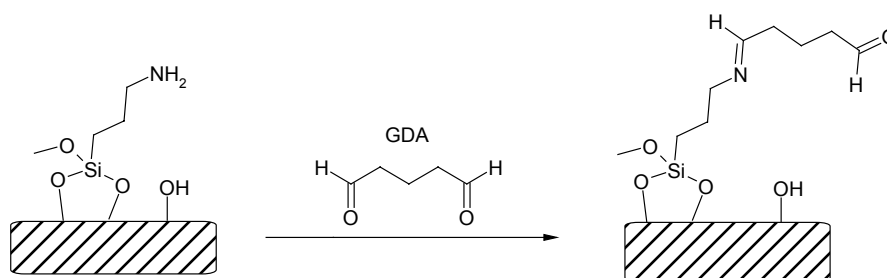


Abbildung 3.1.1: Aktivierung einer aminofunktionalisierten Substratoberfläche mittels Glutardialdehyd (GDA).

<sup>29</sup> Nach der Behandlung von Eisen und Titan mit heißem Wasserdampf beträgt die Anzahl der auf der Oberfläche vorhandenen OH-Gruppen  $4,3/\text{nm}^2$  für Titan und  $2,6/\text{nm}^2$  für Eisen (Simmons und Beard, 1987).

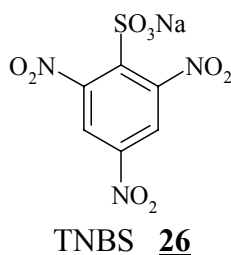
### 3.1.1 Bestimmung der Anzahl eingeführter Aminogruppen

Die Anzahl der auf einer Substratoberfläche eingeführten Aminogruppen kann photometrisch bestimmt werden. Dazu werden zuvor an die Aminogruppen gebundene Chromogen-Moleküle vom Substrat abgelöst, anschließend wird die Extinktion der so erhaltenen Lösung gemessen. Über eine Kalibrationsfunktion oder den Molaren Extinktionskoeffizienten kann daraus die Zahl der vorhandenen Aminogruppen ermittelt werden.

#### 3.1.1.1 *TiAl6V4 als Substrat*

##### 3.1.1.1.1 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)

Erste Versuche zur Bestimmung der Anzahl der über  $\gamma$ -Aminopropyltriethoxysilan (APTES) auf der Oberfläche von TiAl6V4 eingeführten Aminogruppen wurden mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS, **26**) durchgeführt (siehe Abb. 2.6.1).



Die aus vier Versuchsreihen mit jeweils 10 untersuchten Blöcken erhaltene Anzahl der auf der Titanoberfläche eingeführten Aminogruppen beträgt im Mittel  $49 \pm 30 \text{ NH}_2/10 \text{ nm}^2$ . Auffällig ist die breite Streuung der Meßwerte, die von  $16 \text{ NH}_2/10 \text{ nm}^2$  bis zu  $83 \text{ NH}_2/10 \text{ nm}^2$  reicht.

In einer dieser Versuchsreihen (Tabelle 3.1.1) wurden neben der Anzahl der auf der Titanoberfläche eingeführten Aminogruppen ( $68 \pm 11 \text{ NH}_2/10 \text{ nm}^2$ ) auch die nach Aktivierung der Aminogruppen mit Glutardialdehyd (GDA) noch nachweisbaren Aminogruppen ( $35 \pm 6 \text{ NH}_2/10 \text{ nm}^2$ ) bestimmt.

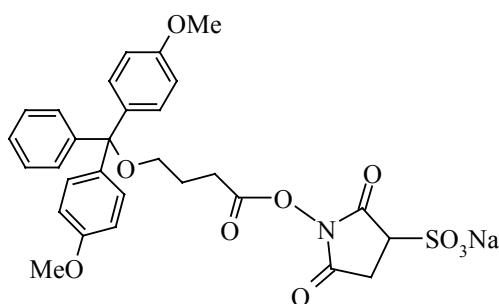
Tabelle 3.1.1: Mittels TNBS bestimmte mittlere Anzahl der auf der Titanoberfläche eingeführten Aminogruppen sowie die nach Aktivierung der Aminogruppen mit GDA noch nachweisbaren Aminogruppen.

TiAl6V4	APTES	GDA	TNBS	NH <sub>2</sub> /10 nm <sup>2</sup>
+	+	-	+	68
+	+	+	+	35

Die Differenz zwischen den freien und den nach Reaktion mit GDA noch bestimmbar  
Aminogruppen beträgt  $33 \text{ NH}_2/10 \text{ nm}^2$  und entspricht der Anzahl aktivierter Aminogruppen  
(etwa 50 %).

#### 3.1.1.1.2 sulfo-N-Succinimidyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat (s-SDTB)

Für alle nachfolgenden Bestimmungen der Anzahl eingeführter Aminogruppen wird an Stelle  
von TNBS ausschließlich sulfo-N-Succinimidyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat (s-SDTB,  
27) verwendet, da es neben der einfacheren Handhabung auch eine größere Empfindlichkeit  
bietet (s.a. Abb. 2.6.2).



s-SDTB 27

Die ersten drei Versuchsreihen (jeweils 10 untersuchte Blöcke) zur Bestimmung der Anzahl  
eingeführter Aminogruppen mit sSDTB ergaben Zahlenwerte zwischen  $21 \pm 5 \text{ NH}_2/10 \text{ nm}^2$   
und  $88 \pm 8 \text{ NH}_2/10 \text{ nm}^2$ . Ebenso wie in den Versuchen mit TNBS fällt auch hier die breite  
Streuung der Meßwerte auf, obwohl die Reaktionsschritte in den drei Versuchsreihen  
möglichst gleichartig durchgeführt wurden. Eine Ausnahme macht lediglich die Verweilzeit  
der Titanblöcke in der abkühlenden Toluol/APTES-Lösung, da sie anfänglich willkürlich  
gewählt wurde. Der Verdacht, daß die Verweilzeit einen wichtigen Parameter darstellt,  
bestätigt sich, wenn die Blöcke bewußt nach 15 Minuten bzw. 45 Minuten aus der  
abkühlenden Reaktionslösung entnommen werden. Tatsächlich findet man für die Blöcke mit  
der kürzeren Verweilzeit weit weniger Aminogruppen ( $42 \pm 7 \text{ NH}_2/10 \text{ nm}^2$ ) als für die länger  
in der Reaktionslösung verbliebenen Blöcke ( $110 \pm 10 \text{ NH}_2/10 \text{ nm}^2$ ).

Die aus sechs weiteren Versuchsreihen mit jeweils 10 untersuchten Blöcken erhaltene Anzahl  
der auf der Titanoberfläche eingeführten Aminogruppen beträgt im Mittel  $19 \pm 7 \text{ NH}_2/10 \text{ nm}^2$   
für eine Verweilzeit von 10 Minuten sowie  $70 \pm 17 \text{ NH}_2/10 \text{ nm}^2$  für eine Verweilzeit von 20  
Minuten.

In drei der sechs Versuchsreihen mit einer Verweildauer der Titanblöcke in der abkühlenden Reaktionslösung von 10 Minuten beträgt die mittlere Zahl eingeführter Aminogruppen  $23 \pm 12$   $\text{NH}_2/10 \text{ nm}^2$ , nach Aktivierung der Aminogruppen mit Glutardialdehyd (GDA) noch  $7 \pm 2$   $\text{NH}_2/10 \text{ nm}^2$ . Bei einer Verweildauer von 20 Minuten erhält man für die Anzahl der auf der Titanoberfläche eingeführten Aminogruppen  $61 \pm 17$   $\text{NH}_2/10 \text{ nm}^2$ , für ihre Anzahl nach Aktivierung mit Glutardialdehyd (GDA) noch  $18 \pm 3$   $\text{NH}_2/10 \text{ nm}^2$  (Tabelle 3.1.2).

Tabelle 3.1.2: Anzahl der mittels sSDTB bestimmten Anzahl der auf der Titanoberfläche eingeführten Aminogruppen sowie die nach Aktivierung der Aminogruppen mit GDA noch nachweisbaren Aminogruppen in Abhängigkeit der Verweilzeit in der abkühlenden Reaktionslösung.

TiAl6V4	APTES	GDA	sSDTB	$\text{NH}_2/10 \text{ nm}^2$ 10 min	$\text{NH}_2/10 \text{ nm}^2$ 20 min
+	+	-	+	23	61
+	+	+	+	7	18

Die Differenz zwischen den freien Aminogruppen und den nach Reaktion mit GDA gefundenen Aminogruppen entspricht der Zahl der aktivierten Aminogruppen. Für 10 min sind das 16  $\text{NH}_2/10 \text{ nm}^2$  (ca. 70 %), für 20 min 43  $\text{NH}_2/10 \text{ nm}^2$  (ca. 70%).

Es zeigt sich also, daß nach Aktivierung der auf der Substratoberfläche eingeführten Aminogruppen mit GDA - in Abhängigkeit der Verweilzeit der Titanblöcke während der Aminofunktionalisierung - für eine Anbindung von Proteinen oder Peptiden zwischen 16 und 43  $\text{NH}_2/10 \text{ nm}^2$  zur Verfügung stehen. Unabhängig von der Belegungsdichte entspricht dies einem Wert von ca. 70 % der insgesamt auf der Oberfläche befindlichen Aminogruppen.

#### 3.1.1.2 $\text{Si}_3\text{N}_4$ als Substrat

Ganz ähnliche Ergebnisse erhält man auch für die Siliziumnitrid-Keramik. Werden die Siliziumnitridblöcke während der Aminofunktionalisierung bewußt länger (30 min) in der abkühlenden Reaktionslösung belassen, so erhält man im Mittel einen Wert von 217  $\text{NH}_2/10 \text{ nm}^2$ . Außer den hier vorgestellten polierten Siliziumnitridblöcken wurden für einige Experimente auch mattierte, sandgestrahlte Siliziumnitridblöcke verwendet. Diese binden bei einer Verweildauer von 30 Minuten lediglich 149  $\text{NH}_2/10 \text{ nm}^2$ . Alle weitergehenden Untersuchungen wurden ausschließlich mit den polierten Blöcken durchgeführt. So beträgt

die aus drei Versuchsreihen mit jeweils sechs untersuchten Blöcken erhaltene Anzahl der auf der Siliziumnitridoberfläche eingeführten Aminogruppen (10 min) im Mittel  $57 \pm 19 \text{ NH}_2/10 \text{ nm}^2$ . Die Werte liegen dabei in einem Bereich zwischen 30 und  $73 \text{ NH}_2/10 \text{ nm}^2$ . Nach Aktivierung der Aminogruppen mit Glutardialdehyd (GDA) findet man  $28 \pm 5 \text{ NH}_2/10 \text{ nm}^2$ .

Tabelle 3.1.3: Zahl der mittels sSDTB bestimmten Anzahl der auf der Siliziumnitridoberfläche eingeführten Aminogruppen sowie die nach Aktivierung der Aminogruppen mit GDA noch nachweisbaren Aminogruppen.

$\text{Si}_3\text{N}_4$	APTES	GDA	sSDTB	$\text{NH}_2/10 \text{ nm}^2$
+	+	-	+	57
+	+	+	+	28

Für die Anbindung von Proteinen oder Peptiden stehen auf der Siliziumnitridoberfläche demnach  $29 \text{ NH}_2/10 \text{ nm}^2$  zur Verfügung (ca. 50%).

### 3.1.2 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Aminofunktionalisierung

Die bisher erfolgten Experimente zeigen, daß die Reaktion sowohl der Legierung TiAl6V4 als auch der Keramik  $\text{Si}_3\text{N}_4$  mit  $\gamma$ -Aminopropyltriethoxysilan (APTES) zur Einführung einer großen Zahl von Aminogruppen auf den jeweiligen Oberflächen führt. Die zur kovalenten Anbindung von Proteinen und Peptiden gewählte Behandlung mit Glutardialdehyd (GDA) aktiviert zwischen 50 und 70 % der insgesamt zur Verfügung stehenden Aminogruppen. Eine Übersicht geben Tabellen 3.1.4 - 3.1.6.

Tabelle 3.1.4: Mittlere Anzahl der mittels GDA aktivierten Aminogruppen ( $\text{NH}_2'$ ) auf TiAl6V4; Bestimmung mit TNBS.

$\text{NH}_2'/10 \text{ nm}^2$	% der Gesamt- $\text{NH}_2$
33	48

Tabelle 3.1.5: Mittlere Anzahl der mittels GDA aktivierten Aminogruppen ( $\text{NH}_2'$ ) auf TiAl6V4; Bestimmung mit sSDTB.

Verweildauer	$\text{NH}_2'/10 \text{ nm}^2$	% der Gesamt- $\text{NH}_2$
10 min	16	71
20 min	43	70



Tabelle 3.1.6: Mittlere Anzahl der mittels GDA aktivierten Aminogruppen ( $\text{NH}_2'$ ) auf  $\text{Si}_3\text{N}_4$ ; Bestimmung mit sSDTB.

Verweildauer	$\text{NH}_2'/10\text{nm}^2$	% der Gesamt- $\text{NH}_2$
10 min	29	51

### 3.1.3 Anbindung von Proteinen an aminofunktionalisierte Festkörperoberflächen

Die mit Glutardialdehyd (GDA) aktivierten Alkylsilane können nun mit den gewünschten Proteinen oder Peptiden zur Reaktion gebracht werden, um diese kovalent an die Substratoberfläche zu binden (Abbildung 3.1.2; s. a. Abb. 2.1.2).

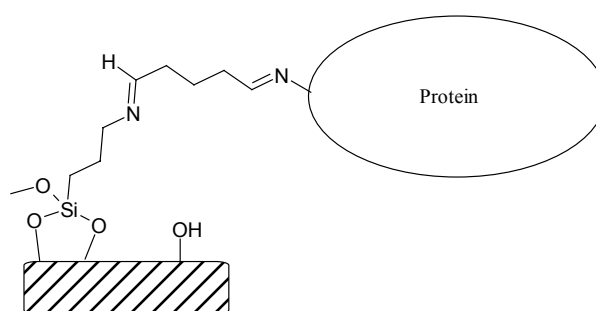


Abbildung 3.1.2: An mit Glutardialdehyd (GDA) aktiviertes Alkylsilan gekoppeltes Protein.

Um die Protein-Anbindung verfolgen und beurteilen zu können ist es notwendig, ein geeignetes Verfahren zur Feststellung der Anzahl gebundener Moleküle zur Verfügung zu haben. Für einen empfindlichen, kostengünstigen, schnell und einfach durchzuführenden Nachweis eignet sich das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) in Verbindung mit dem Chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). Zur quantitativen Ermittlung der gebundenen Proteinmenge muß dafür photometrisch eine Kalibrationskurve erstellt werden, die eine Beziehung zwischen der Extinktion der Chromogenlösung und der Konzentration des Enzyms herstellt. Wird die Aktivität der Peroxidase bei verschiedenen pH-Werten betrachtet, so stellt man eine relativ starke Abhängigkeit fest (Abbildung 3.1.3). Die größte Aktivität erreicht das Enzym bei etwa pH 5, so daß für die Aktivitätsmessungen ein Acetat-Puffer verwendet wird.

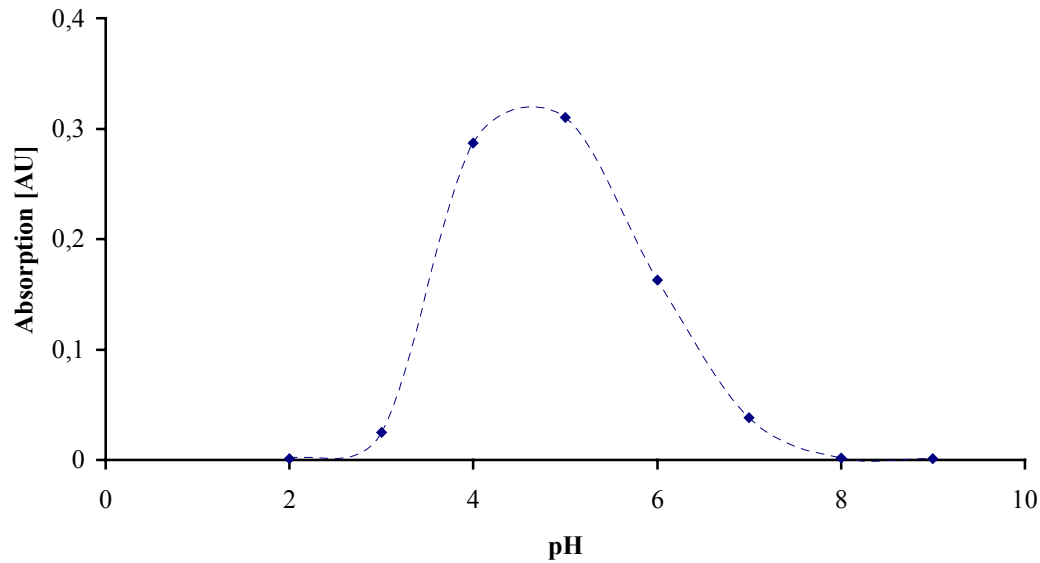


Abbildung 3.1.3: Abhängigkeit der HRP-Aktivität vom pH-Wert.

#### 3.1.3.1 Bindung von HRP an aminofunktionalisiertes und mittels GDA aktiviertes $\text{Si}_3\text{N}_4$

In einem ersten Experiment wird Meerrettichperoxidase an das mit APTES und GDA behandelte Siliziumnitrid gebunden. Um die Aktivität des gebundenen Enzyms bestimmen zu können, müssen die Siliziumnitridblöcke nach ihrer Entnahme aus der Proteinlösung erst ausgiebig gewaschen werden (siehe Tabelle 3.1.7). Über die anschließend photometrisch bestimmte Aktivität des noch an das Substrat gebundenen Enzyms erhält man eine Belegungsdichte der Oberfläche von 68 Meerrettichperoxidase-Molekülen pro  $\mu\text{m}^2$  ( $\text{HRP}/\mu\text{m}^2$ ).

Tabelle 3.1.7: Photometrisch bestimmte HRP-Konzentration in den einzelnen Waschüberständen, angegeben in pro Flächeneinheit abgelösten HRP-Molekülen.

Waschschritt Nr.	Moleküle HRP/ $\mu\text{m}^2$
1	$3,5 \cdot 10^6$
2	$2,0 \cdot 10^4$
3	3300
4	270
5	62

Tabelle 3.1.7 kann man entnehmen, daß die aus der Proteinlösung entnommenen Blöcke zumindest fünfmal mit Pufferlösung gewaschen werden müssen, um locker adsorbiertes Protein soweit abzulösen, daß die Aktivität der Waschlösung letztlich kleiner ist als die Aktivität der an das Substrat gebundenen HRP-Moleküle.

### 3.1.3.2 Bindung von HRP an aminofunktionalisiertes und mittels GDA aktiviertes TiAl6V4

Ein Vergleich mit der in gleicher Weise behandelten Titanlegierung zeigt, daß hier ebenfalls ausgiebig gewaschen werden muß. Erst nach fünfmaligem Waschen liegt die Zahl der pro Flächeneinheit abgelösten HRP-Moleküle unterhalb der Zahl der pro Flächeneinheit auf dem Substrat verbliebenen HRP-Moleküle. In allen nachfolgenden Experimenten werden die Substratblöcke vor den Aktivitätsmessungen also jeweils fünfmal mit Pufferlösung gewaschen.

In Abbildung 3.1.4 sind die Ergebnisse der Messungen im Überstand der beiden letzten Waschschrte sowie die Ergebnisse der Messungen am Substrat nach dem letzten Waschschrte dargestellt. Alle Werte beziehen sich auf das Ergebnis für den Überstand des vorletzten Waschschrtes am nicht aktivierten Substrat (= 100%).

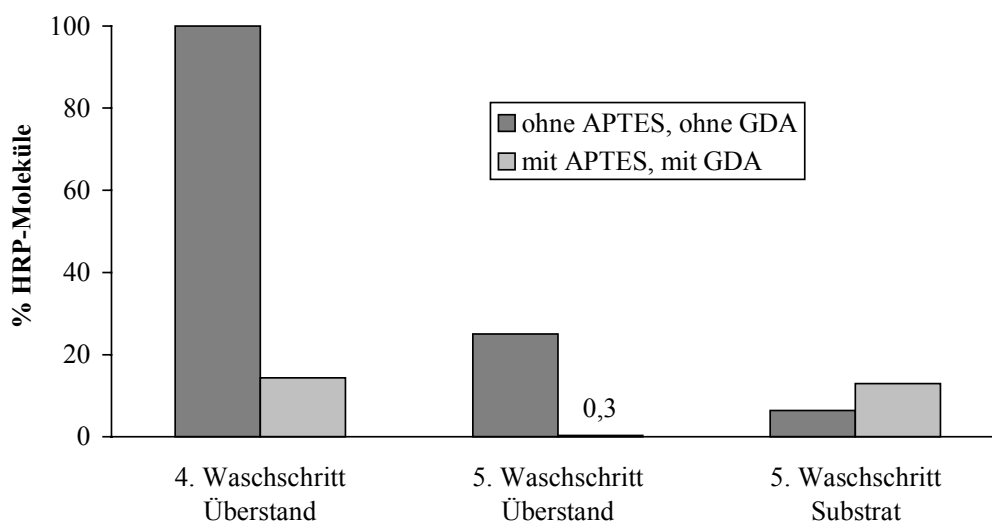


Abbildung 3.1.4: HRP-Moleküle auf mit APTES und GDA behandeltem TiAl6V4. Außerdem dargestellt sind die abgelösten HRP-Moleküle im Überstand des letzten und vorletzten Waschschrtes. Angegeben sind die %Werte bezogen auf den Meßwert des Überstandes des vorletzten Waschschrtes am Substrat ohne APTES und ohne GDA (= 100%).

Betrachtet man die ausschließlich adsorptive Bindung von HRP an die Titanblöcke, so zeigt sich, daß von den mit APTES behandelten Blöcken weit mehr Proteinmoleküle gebunden werden als von den unbehandelten oder nur mit Glutardialdehyd behandelten Blöcken (siehe Tabelle 3.1.8).

Tabelle 3.1.8: Adsorption von HRP-Molekülen an unterschiedlich behandelte Titan-Oberflächen; Mittelwerte bestimmt aus zwei (**a** und **b**) bzw. drei (**c**) Versuchsreihen mit jeweils drei untersuchten Blöcken für jede Variation.

TiAl6V4	APTES	GDA	HRP	Moleküle HRP/ $\mu\text{m}^2$
+	-	-	+	51 $\pm$ 16 ( <b>a</b> )
+	-	+	+	19 $\pm$ 5 ( <b>b</b> )
+	+	-	+	82 $\pm$ 36 ( <b>c</b> )

Werden die nach erfolgter Aminosilylierung eingeführten Aminogruppen mit Glutardialdehyd aktiviert, so steigt die Zahl der gebundenen Proteinmoleküle deutlich an. Aus der Differenz der an die Titanblöcke adsorptiv sowie über aktivierte Aminogruppen kovalent gebundenen HRP-Moleküle und des nur adsorptiv an die Titanblöcke gebundenen Enzyms, erhält man in guter Näherung die Zahl der kovalent gebundenen HRP-Moleküle (Tabelle 3.1.9).

Tabelle 3.1.9: Anzahl der pro Flächeneinheit an TiAl6V4 gebundenen HRP-Moleküle in Abhängigkeit der Vorbehandlung der Substratoberfläche; Mittelwerte bestimmt aus drei Versuchsreihen mit jeweils drei untersuchten Blöcken für jede Variation. **B** steht für die adsorptive Bindung, **A** für die Gesamtanbindung (adsorptiv + kovalent). Durch Differenzbildung **A** - **B** erhält man in guter Näherung die Zahl der kovalent gebundenen HRP-Moleküle (**C**).

	TiAl6V4	APTES	GDA	HRP	Moleküle HRP/ $\mu\text{m}^2$	%
<b>A (adsorptiv + kovalent)</b>	+	+	+	+	149 $\pm$ 55	100
<b>B (adsorptiv)</b>	+	+	-	+	82 $\pm$ 36	55
<b>C (kovalent) = (A - B)</b>					67	45

Verwendet man für den letzten Waschschriff anstelle des Phosphat-Puffers eine 0,5%ige SDS-Lösung, so nähert man sich durch die nun leichter erfolgende Ablösung der noch stärker adsorptiv am Substrat anhaftenden Proteinmoleküle dem oben durch Differenzbildung erhaltenen Wert für die pro Flächeneinheit kovalent an das Substrat gebundenen HRP-Moleküle an (siehe Tabelle 3.1.10).

Tabelle 3.1.10: Anzahl der pro Flächeneinheit an TiAl6V4 gebundenen HRP-Moleküle in Abhängigkeit der Waschschrte; Mittelwerte bestimmt aus drei Versuchsreihen mit jeweils drei untersuchten Blöcken für jede Variation. **A** steht für die Gesamtanbindung (adsorptiv + kovalent) und **A / SDS** für die nach Behandlung mit denaturierendem Detergens verbleibende Zahl der kovalent gebundenen HRP-Moleküle.

	TiAl6V4	APTES	GDA	HRP	SDS	Moleküle HRP/ $\mu\text{m}^2$	%
<b>A</b>	+	+	+	+	-	149 $\pm$ 55	100
<b>A / SDS</b>	+	+	-	+	+	56 $\pm$ 21	38

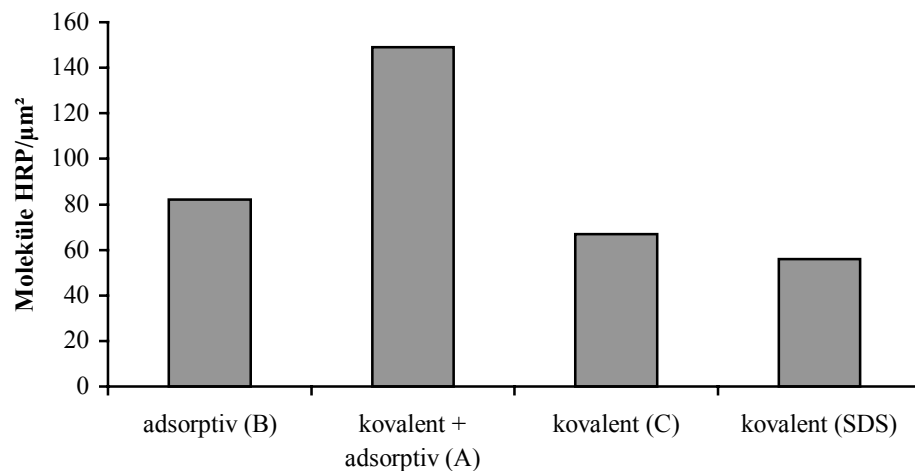


Abbildung 3.1.5: Kovalenter Anteil der insgesamt (adsorptiv + kovalent) an das mit APTES und GDA behandelte TiAl6V4 gebundenen HRP-Moleküle. Sowohl durch Differenzbildung (**C = A - B**) als auch durch die Diskriminierung der adsorptiv gebundenen HRP-Moleküle durch Behandlung mit einer 0,5%igen SDS-Lösung (**SDS**) läßt sich der Anteil der kovalent gebundenen HRP-Moleküle in guter Näherung bestimmen.

Wird anstelle der 0,5%-igen SDS-Lösung eine 8M Harnstofflösung verwendet, so zeigt sich, daß damit die noch adsorptiv anhaftenden HRP-Moleküle nicht vollständig vom Substrat gelöst werden können (siehe Tabelle 3.1.11).

Tabelle 3.1.11: Anzahl der pro Flächeneinheit an TiAl6V4 gebundenen HRP-Moleküle in Abhängigkeit der Waschschrte; Mittelwerte bestimmt aus drei Versuchsreihen mit jeweils drei untersuchten Blöcken für jede Variation.

	Moleküle HRP/ $\mu\text{m}^2$	%
<b>B (adsorptiv)</b>	70 $\pm$ 32	51
<b>A (adsorptiv + kovalent)</b>	138 $\pm$ 45	100
<b>C (kovalent) = (A - B)</b>	68	49
<b>A (adsorptiv + kovalent) /Harnstoff</b>	100 $\pm$ 25	72

In Abbildung 3.1.6 sind die Ergebnisse aus Tabelle 3.1.11 nochmals graphisch dargestellt:

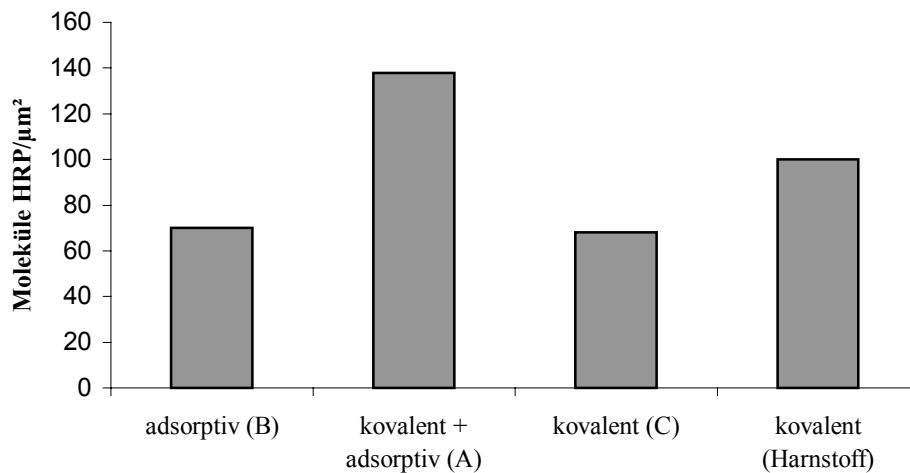


Abbildung 3.1.6: Kovalenter Anteil der insgesamt (adsorptiv + kovalent) an das mit APTES und GDA behandelte TiAl6V4 gebundenen HRP-Moleküle. Der durch Differenzbildung ( $C = A - B$ ) erhaltene Wert für den kovalenten Anteil der gebundenen HRP-Moleküle liegt deutlich unter dem durch die Diskriminierung der adsorptiv gebundenen HRP-Moleküle durch Behandlung mit einer 8M Harnstofflösung gefundenen Wert (**Harnstoff**).

Durch Verwendung von 8M Harnstofflösung anstelle des sonst verwendeten Phosphatpuffers nähert man sich durch eine verstärkte Ablösung von adsorptiv gebundenen HRP-Molekülen zwar ebenfalls der Zahl kovalent pro Flächeneinheit gebundener HRP-Moleküle an, allerdings sehr viel schlechter als in dem zuvor mit SDS durchgeführten Experiment.

### 3.2 Immobilisierung von Proteinen an Materialien für den Weichgewebekontakt

Zur kovalenten Anbindung von Proteinen bzw. Peptiden an Poly-D,L-Lactidfolie, muß diese auf ihrer Oberfläche mit geeigneten funktionellen Gruppen versehen werden. Eine neuere Methode verwendet dazu eine Behandlung der Folie mit einem Niedertemperatur-Argon Plasma, wodurch auf der Oberfläche "Radikalstellen" erzeugt werden, die in Anwesenheit von Sauerstoff zu Peroxiden und Hydroperoxiden reagieren. Die bei Raumtemperatur metastabilen Peroxide werden photolytisch gespalten und dienen so in Gegenwart einer wäßrigen Acrylsäurelösung als Initiatoren einer Pfropfcopolymerisation (Thissen, 1998).

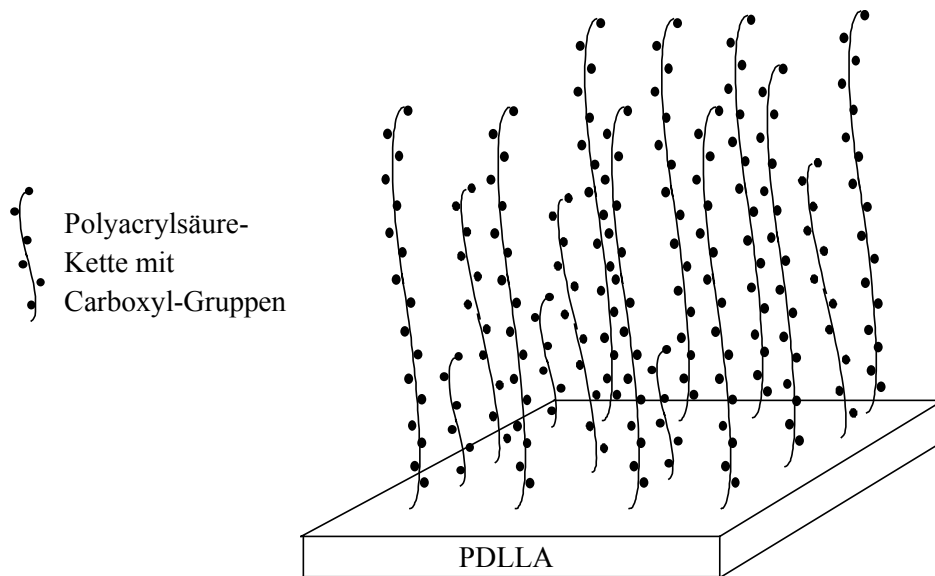


Abbildung 3.2.1: Anordnung der gefropften Polyacrylsäure-Ketten auf der Oberfläche der PDLLA-Folie.

An diese mit Polyacrylsäure gefropften Poly-D,L-Lactid-Folien können nun - nach Überführung der Carboxylgruppen in die entsprechenden N-Hydroxysuccinimid-Aktivester - Proteine und Peptide über darin vorhandene freie Aminogruppen kovalent gebunden werden (Abbildung 3.2.2; s.a. Abb. 2.2.1).

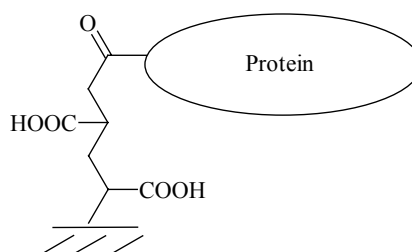


Abbildung 3.2.2: Kovalent an Polyacrylsäure-Kette gebundenes Protein.

Die Zahl der adsorptiv und kovalent gebundenen Proteinmoleküle lässt sich im Falle von HRP analog Kapitel 3.1.3 ebenfalls über dessen Aktivität bestimmen. Da die Experimente allerdings mit einer Vielzahl Proteine und Peptide durchgeführt werden (und auch aufgrund der leichten Zugänglichkeit), wird zur Beurteilung der erzielten Bindungsdichten ausschließlich die Aminosäureanalyse herangezogen. Die mit HRP photometrisch ermittelten Aktivitäten leisteten allerdings wertvolle Dienste zur schnellen Abschätzung der relativen Bindungsverhältnisse.

In Tabelle 3.2.1 sieht man die Daten der Aminosäureanalyse eines Experiments, in dem Meerrettichperoxidase (HRP) entweder mit (Probe B) oder aber ohne (Probe A) Kopplungsreagenz (EDC/NHS) an mit Polyacrylsäure gepfropfte PDLLA-Folie gebunden wird. Das in Abwesenheit von EDC/NHS gebundene Protein (Probe A) spiegelt dabei den adsorbierten Anteil wieder. Die Aminosäureanalyse erlaubt sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Proteinbestimmung. Aus den Konzentrationen der stabilen Aminosäuren und der bekannten Aminosäure-Zusammensetzung des Proteins kann die Zahl der gefundenen Aminosäurereste berechnet werden und mit der theoretischen Zusammensetzung verglichen werden. Der Vergleich der experimentellen Daten von Probe B zeigt deutlich, daß es sich bei dem untersuchten Protein tatsächlich um HRP handelt.

Tabelle 3.2.1: Aminosäureanalyse von adsorptiv und kovalent an mit Polyacrylsäure gepfropfter poly-D,L-Lactid-Folie gebundener Meerrettichperoxidase (HRP). Die in der Aminosäureanalyse gefundene Menge [pmol] für A ist zu gering, um eine sichere Aussage treffen zu können. Die 'Anzahl' bezieht sich also auf Experiment B.

<b>Experiment</b>	<b>A</b>	<b>B</b>		
<b>PDLLA</b>	+	+		
<b>AAC</b>	+	+		
<b>EDC/NHS</b>	-	+		
<b>HRP</b>	+	+		
<b>Aminosäure</b>	<b>[pmol]</b>	<b>[pmol]</b>	<b>Anzahl gefunden</b>	<b>Anzahl theoretisch</b>
<b>Asx</b>	213,66	9671,93	47,26	48
<b>Thr</b>	96,64	4425,98	21,63	25
<b>Glx</b>	351,53	4487,87	21,93	20
<b>Ala</b>	182,85	4912,51	24,00	23
<b>Ile</b>	111,55	2636,89	12,88	13
<b>Leu</b>	225,11	7070,27	34,55	35
<b>Tyr</b>	230,96	900,80	4,40	5
<b>Lys</b>	143,51	1414,70	6,91	6

Die aus der Aminosäureanalyse erhaltenen Daten (Tabelle 3.2.2) zeigen, daß in Anwesenheit der Kopplungsreagenzien die Menge gebundenen Proteins deutlich ansteigt: ohne EDC/NHS werden nur 0,03 nmol HRP/cm<sup>2</sup> gebunden, mit EDC/NHS steigt dieser Wert auf 0,41 nmol HRP/cm<sup>2</sup> an. Werden diese Daten in Moleküle pro Flächeneinheit umgerechnet, so werden etwa 25 Moleküle pro 10 nm<sup>2</sup> gebunden (davon 1,5 adsorptiv und 23 kovalent).



Tabelle 3.2.2: Die aus den Aminosäureanalysen berechnete Zahl der adsorptiv und kovalent an die gepfropfte poly-D,L-Lactid-Folie gebundenen HRP-Moleküle.

Experiment	A	B	B-A
[pmol/Rest]	7,03	206,60	199,57
[nmol/cm <sup>2</sup> ]	0,03	0,41	0,39
[µg/cm <sup>2</sup> ]	0,86	14,01	13,16
[Moleküle/10nm <sup>2</sup> ]	1,52	24,88	23,36
[% der Gesamtanbindung]	5,80	100	94,20
Bindungstyp	adsorptiv	Gesamtanbindung	kovalent

Die Ergebnisse der Bindungsstudien mit weiteren Proteinen werden in Tabelle 3.2.3 zusammengefaßt: Meerrettichperoxidase (HRP – Mr 44000), Rinderserumalbumin (BSA – Mr 66406), Rinderserum Fibronektin (FN – Mr 499088 für das Dimer). Alle Experimente wurden als Doppelbestimmung durchgeführt und mindestens dreifach wiederholt.

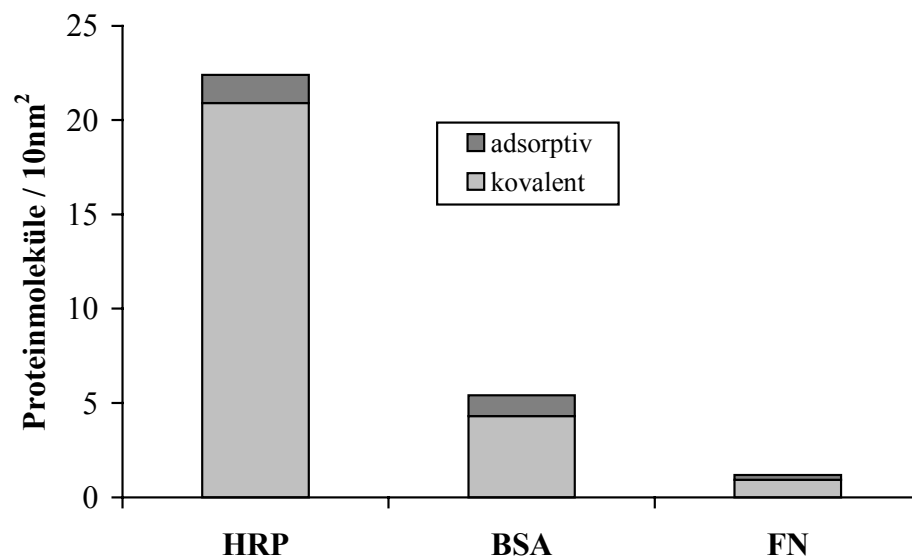


Abbildung 3.2.3: Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 3.2.3– adsorptiv und kovalent an die gepfropfte poly-D,L-Lactid-Folie gebundene Proteinmoleküle (Meerrettichperoxidase, Rinderserumalbumin, Rinderserum Fibronektin).

Tabelle 3.2.3: Die aus der Aminosäureanalyse berechnete Zahl der adsorptiv und kovalent an die gepfropfte poly-D,L-Lactid-Folie gebundenen Moleküle einiger ausgewählter Proteine: a) HRP, b) BSA, c) FN.

a)

	PDLLA	AAC	EDC/NHS	HRP *)	[Moleküle/10nm <sup>2</sup> ]	[%]
Leerwert	+	-	-	-	0,0	0,0
Leerwert	+	-	+	+	0,6	2,7
(A) adsorptiv	+	+	-	+	1,5	6,8
(B) Gesamtanbindung	+	+	+	+	22,4	100
(C) kovalent	= Gesamtanbindung (B) - adsorptiv (A)					93,2

\*) Meerrettich Peroxidase Mr 33918 (ca. 44000 inkl. Kohlenhydrat-Anteil)

b)

	PDLLA	AAC	EDC/NHS	BSA §)	[Moleküle/10nm <sup>2</sup> ]	[%]
Leerwert	+	-	-	-	0,0	0
Leerwert	+	-	+	+	-	-
(A) adsorptiv	+	+	-	+	1,1	20,4
(B) Gesamtanbindung	+	+	+	+	5,4	100
(C) kovalent	= Gesamtanbindung (B) - adsorptiv (A)					79,6

§) Rinderserum Albumin Mr 66406

c)

	PDLLA	AAC	EDC/NHS	FN #)	[Moleküle/10nm <sup>2</sup> ]	[%]
Leerwert	+	-	-	-	0,0	0,0
Leerwert	+	-	+	+	0,06	5,5
(A) adsorptiv	+	+	-	+	0,25	21,4
(B) Gesamtanbindung	+	+	+	+	1,19	100
(C) kovalent	= Gesamtanbindung (B) - adsorptiv (A)					78,6

#) Rinderplasma Fibronektin Mr 499088 (dimer)

Gleichartige Experimente wurden ebenfalls mit zwei kleinen Peptiden durchgeführt. Die Ergebnisse für die beiden Peptide, die beide Zellbindungsaktivität besitzen, werden in Abbildung 3.2.4 und Tabelle 3.2.4 gezeigt. Eines dieser auch als RGD-Peptide bezeichneten Peptide (Sequenz:RGDSPASSKP; Mr 1001,13) wird in einer Zahl von etwa 53 Molekülen adsorptiv gebunden, mit Kopplungsreagenz steigt diese Zahl auf 439 Moleküle pro  $10 \text{ nm}^2$  an, so daß etwa 90% der Peptidmoleküle kovalent gebunden sind. Das kleinere der beiden Laminin-Peptide (Sequenz:SIKVAV; Mr 615,9) liefert ähnliche Ergebnisse: werden 68 Moleküle ohne EDC/NHS gebunden, so werden mit Kopplungsreagenz 1900 Moleküle kovalent gebunden, das sind 96%.

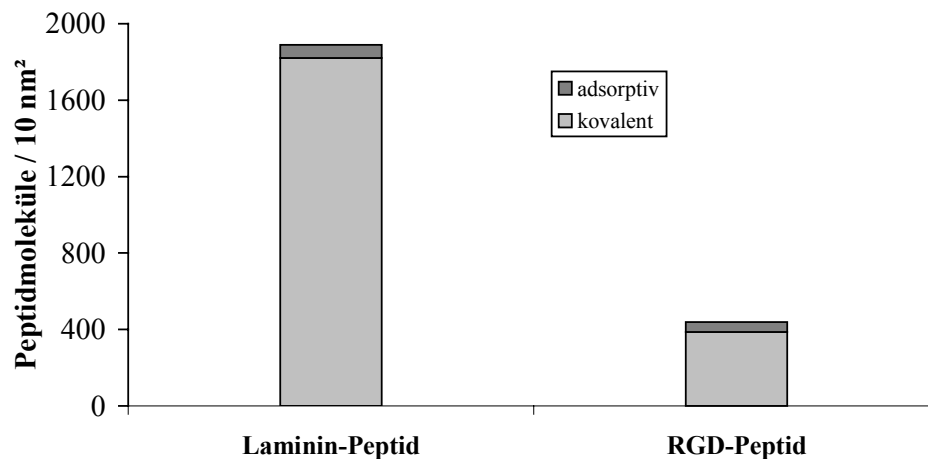


Abbildung 3.2.4: Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 3.2.4 - adsorptiv und kovalent an die gepfropfte poly-D,L-Lactid-Folie gebundene Peptide (Laminin-Peptid und RGD-Peptid).

Tabelle 3.2.4: Aminosäureanalyse von adsorptiv und kovalent an mit Polyacrylsäure gepfropfter poly-D,L-Lactid-Folie gebundenen Peptiden: a) RGD-Peptid, b) Laminin-Peptid.

**a)**

	PDLLA	AAC	EDC/NHS	RGD-Peptid *)	[Moleküle/10nm <sup>2</sup> ]	[%]
Leerwert	+	-	-	-	0	0
(A) adsorptiv	+	+	-	+	53	12
(B) Gesamtanbindung	+	+	+	+	439	100
(C) kovalent	= Gesamtanbindung (B) - adsorptiv (A)					88

\*) RGD-Peptid: RGDSPASSKP Mr 1001,13 Da

**b)**

	PDLLA	AAC	EDC/NHS	Laminin-Peptid **)	[Moleküle/10nm <sup>2</sup> ]	[%]
Leerwert	+	-	-	-	0	0
(A) adsorptiv	+	+	-	+	68	4
(B) Gesamtanbindung	+	+	+	+	1880	100
(C) kovalent	= Gesamtanbindung (B) - adsorptiv (A)					96

\*\*) Laminin-Peptid: SIKVAV Mr 615,9 Da

Die Ergebnisse für die Proteine und Peptide sind in Tabelle 3.2.5 zusammengefasst und werden mit der relativen Molekülmasse ( $M_r$ ) verglichen. Die Korrelation ist dabei eindeutig: werden zwischen 200 und 2000 Moleküle des kleinen Peptides pro  $10 \text{ nm}^2$  gebunden, so reicht die Bindungsdichte der Proteine von 35 Molekülen im Fall von Interleukin-6 bis zu 0,5-1 Molekülen im Falle von Fibronektin. Dabei muss angemerkt werden, dass die Varianz im Wesentlichen von der Güte der Pfropfung abhängig ist.

Tabelle 3.2.5: Korrelation der Molekularen Massen mit den jeweiligen Bindungsdichten.

Peptide und Proteine	$M_r$ in Dalton	Moleküle / $10 \text{ nm}^2$
Laminin-Peptid *)	616	400 - 2000
RGD-Peptid **)	1001	200 - 500
Interleukin-6	20909	20 - 35
Meerrettichperoxidase	44000	10 - 30
Rinderserumalbumin	66406	4 - 6
Rinderplasmafibronektin ***)	499088	0,5 - 1

\*) Laminin-Peptid: SIKVAV, \*\*) RGD-Peptid: RGDSPASSKP, \*\*\*) Dimer

Offensichtlich werden die Bindungsdichten der verschiedenen Proteine von ihrer relativen Größe und ihrem relativen Raumbedarf bestimmt.

Für ein genaueres Bild der Bindungsverhältnisse wurden weitere Experimente mit einem Dipeptid (Val-Lys; VK) und einem Protein (BSA) durchgeführt, die jeweils einzeln, gleichzeitig oder nacheinander verwendet wurden. In den ersten Experimenten wurde gepfropfte poly-D,L-Lactidfolie mit VK oder BSA alleine (Experimente A und B) behandelt. So können jeweils 225 Moleküle VK oder 3,9 Moleküle BSA pro  $10 \text{ nm}^2$  gebunden werden. Mit Hilfe der Aminosäureanalyse kann dabei zwischen adsorptiv und kovalent unterschieden werden. Werden beide Spezies gleichzeitig angeboten, so binden 293 Moleküle VK und 3,2 Moleküle BSA (Experiment C). Wird schließlich zuerst mit BSA und daran anschließend mit VK behandelt, so werden beinahe keine Dipeptid-Moleküle mehr gebunden (Experiment E). Wieder werden pro  $10 \text{ nm}^2$  zwischen 3 und 4 Moleküle BSA gebunden, allerdings nur noch 18 Moleküle VK. Dieser Wert liegt an der unteren Nachweisgrenze der Aminosäureanalyse und stellt gegenüber den Experimenten A, B und C eine Verminderung der Anbindung des Dipeptides um etwa 90% dar (Tabelle 3.2.6).

Tabelle 3.2.6: Gleichzeitige und nacheinander erfolgende Anbindung von BSA und dem Peptid VK an mit Polyacrylsäure gefropfte poly-D,L-Lactidfolie.

PDLA-AAC + EDC/NHS					
Reihenfolge der Anbindung	einzeln		gleichzeitig	nacheinander	
	A	B		D	E
1. Behandlung					
VK	+	-	+	+	-
BSA	-	+	+	-	+
2. Behandlung					
VK	-	-	-	-	+
BSA	-	-	-	+	-
VK [Moleküle / 10 nm <sup>2</sup> ]	225,3	-	292,8	230,2	18,1
BSA [Moleküle / 10 nm <sup>2</sup> ]	-	3,9	3,2	3,9	3,3

Die Ergebnisse zeigen, daß bei gleichzeitig zugegebenem Peptid und Protein (Experiment C) die jeweilige Bindungsdichte nicht wesentlich von der Einzelanbindung abweicht. Das selbe Ergebnis erhält man, wenn zuerst das Dipeptid angeboten wird und anschließend das Protein (Experiment D).

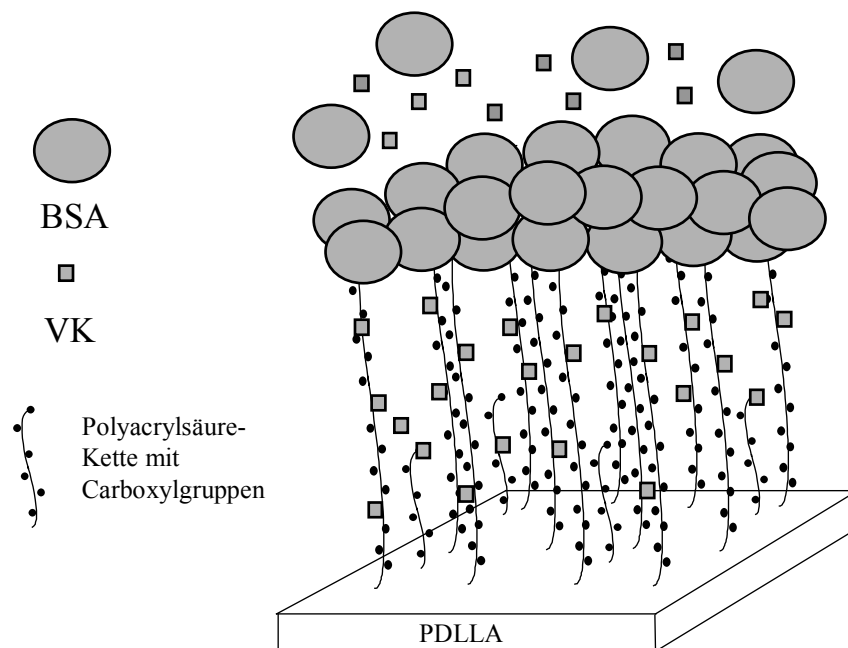


Abbildung 3.2.5: Modell der Anordnung von BSA und dem Peptid VK, die unter verschiedenen Bedingungen auf der gepfropften PDLA-Folie immobilisiert wurden: gleichzeitige Anbindung von VK und BSA; Anbindung von VK mit nachfolgender Anbindung von BSA (Experiment C + D).

Wird jedoch zuerst BSA angeboten, werden kaum noch VK Moleküle gebunden (Experiment E). Offensichtlich bilden die BSA Moleküle eine dichte und undurchdringliche Schicht, die darunterliegende Carboxylgruppen vor der Reaktion mit VK abschirmt.

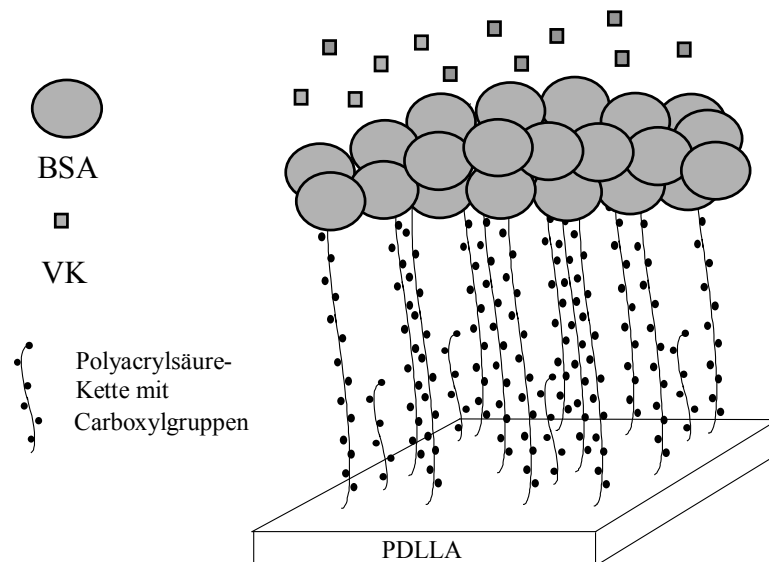


Abbildung 3.2.6: Modell der Anordnung von BSA und dem Peptid VK nach Anbindung von BSA mit nachfolgender Anbindung von VK (Experiment E).

Zusammengefasst bietet die mit Polyacrylsäure gepfropfte poly-D,L-lactid Folie interessante Möglichkeiten, um große Mengen Protein und Peptid ( $20 - 30 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ ) anzubinden. Der Prozentsatz der adsorptiven Bindung liegt zwischen 5% und 40% der Gesamtanbindung und hängt außer von der Qualität der Pfropfung auch von der Natur der Proteine und Peptide ab.

### 3.3 *In-vitro* Erzeugung Reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies zur Modifizierung von Aminosäuren und Proteinen

Durch die insbesondere bei Entzündungsreaktionen im Gewebe gebildeten "Reaktiven Sauerstoff Spezies" (ROS), sind im Körper befindliche Proteine vielerlei Veränderungen unterworfen. Die dabei im Mittelpunkt stehenden ROS sind das Hydroxylradikal ( $\text{OH}^\cdot$ ), die Hypochlorige Säure ( $\text{HOCl}$ ) sowie die Peroxosalpetrige Säure ( $\text{HOONO}$ ), die neben oxidativen Veränderungen der Protein-Seitenketten und des Protein-Rückgrates auch zu Hydroxylierung, Chlorierung und Nitrierung der aromatischen Seitenketten führen (Abbildung 3.3.1).



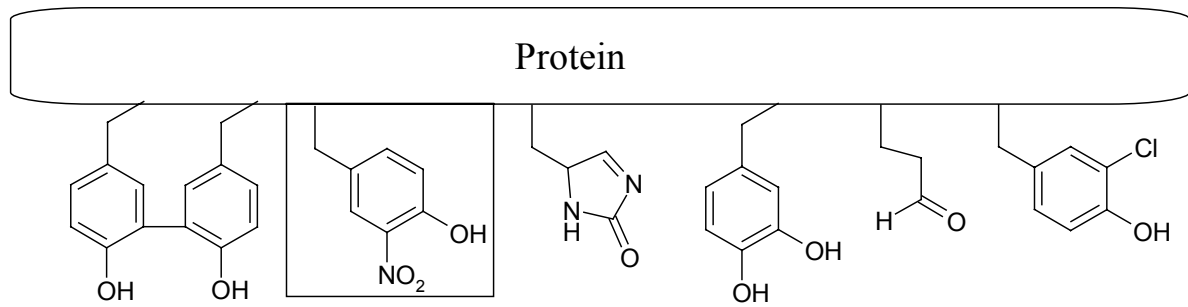


Abbildung 3.3.1: Darstellung einiger durch ROS modifizierter Aminosäurereste in Proteinen. Die für diese Arbeit im Folgenden besonders wichtige Modifizierung ist durch einen Kasten hervorgehoben.

Das Ausmaß dieser Veränderungen kann über einige der durch die Interaktion der ROS mit den Proteinen gebildeten Reaktionsprodukte bestimmt werden, wobei diese als qualitative und quantitative Marker für den oxidativen Stress dienen (Tabelle 3.3.1).

Tabelle 3.3.1: Übersicht einiger wichtiger Marker für oxidativen Streß.

Agens	Marker	Nachweis
HOCl	3-Chlorotyrosin	HPLC
HOONO	3-Nitrotyrosin	HPLC, ELISA
OH-Radikal	$\Delta$ Carbonylgehalt	UV/VIS

Für die qualitative und quantitative Untersuchung dieser Reaktionen *in vitro* ist die Verfügbarkeit der interessierenden reaktiven Spezies im Labor Voraussetzung. Da in der vorliegenden Arbeit das Hauptaugenmerk auf die Hypochlorige Säure, die Peroxosalpetrige Säure sowie das Hydroxylradikal gerichtet ist, werden im Folgenden die Reaktionen dieser drei Oxidantien qualitativ untersucht.

### 3.3.1 Hypochlorige Säure

Die Hypochlorige Säure kann durch Ansäuern einer handelsüblichen Natriumhypochlorit-Lösung erhalten werden. Ihre chlorierende Wirkung wird durch die Umsetzung von Tyrosin zu 3-Chlorotyrosin über HPLC mit UV/VIS-Detektion nachgewiesen. Dazu wird eine wäßrige Tyrosinlösung mit einer Natriumhypochloritlösung im Verhältnis 100:1 gemischt und angesäuert. Zur Überprüfung des Ergebnisses wird nach Anheben des pH-Wertes auf 7,4 isokratisch über eine RP-18 Säule getrennt.

Durch Übereinanderlegen eines Chromatogramms von 3-Chlorotyrosin als Vergleichs-Standard und des Chromatogramms der Umsetzung von Tyrosin mit HOCl (Abbildung 3.3.2) läßt sich anschaulich zeigen, daß die Hypochlorige Säure (bzw. eine Natriumhypochlorit-Lösung) unter geeigneten Rahmenbedingungen in der Lage ist, Tyrosin am aromatischen Kohlenstoff-Ring zu chlorieren. Entscheidenden Einfluß hat hierbei der pH-Wert, so daß eine Chlorierung erst ab einem pH-Wert  $< 3$  zu beobachten ist.

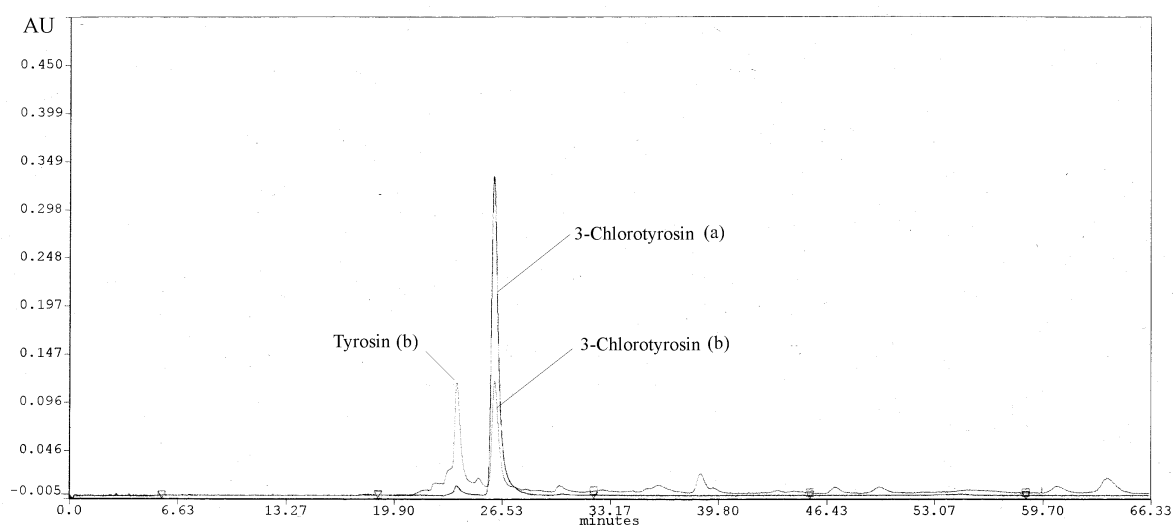


Abbildung 3.3.2: Chromatogramm von (a) 3-Chlorotyrosin (Standard) und von (b) mit HOCl behandeltem Tyrosin. Inj. 200  $\mu$ l (entsprechend 600 nmol Tyr). Isokratische Elution mit einem Puffer aus 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 3,5 und Methanol in einem Verhältnis von 70:30. Detektion bei 280 nm.

A. van der Vliet et al. (Eiserich et al., 1996) berichten über eine nitrierende Spezies, die sich aus HOCl und dem Nitrit-Anion bilden kann (Nitrylchlorid,  $\text{Cl-NO}_2$ ). Wird in unseren Experimenten die Natriumhypochloritlösung in Gegenwart von Nitrit-Ionen zu einer Tyrosinlösung gegeben, so findet sowohl bei pH 2 als auch bei pH 5 eine Nitrierung anstelle einer Chlorierung von Tyrosin statt (ohne Zugabe der Natriumhypochloritlösung findet keine Nitrierung statt). Eine gleichzeitige Chlorierung wird nicht beobachtet. In Abbildung 3.3.3 ist dies anhand eines Chromatogramms der Umsetzung von Tyrosin mit HOCl in Gegenwart von Nitrit-Ionen sowie eines darübergelegten Chromatogramms von 3-Nitrotyrosin als Vergleichs-Standard gezeigt.

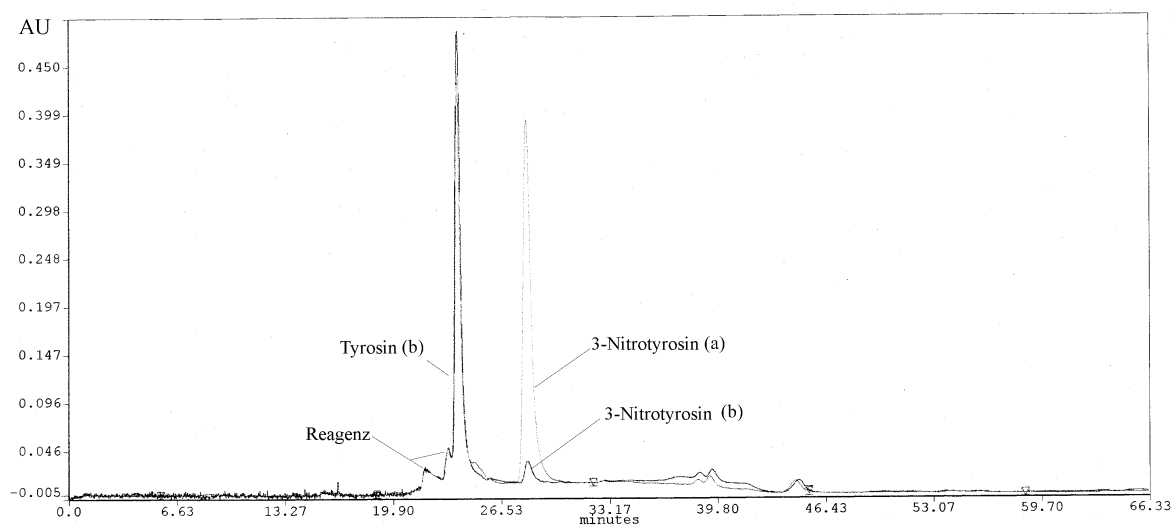


Abbildung 3.3.3: Chromatogramm von (a) 3-Nitrotyrosin (Standard) und von (b) mit  $\text{NO}_2^-/\text{HOCl}$  behandeltem Tyrosin. Inj. 200  $\mu\text{l}$  (entsprechend 600 nmol Tyr). Isokratische Elution mit einem Puffer aus 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 3,5 und Methanol in einem Verhältnis von 70:30. Detektion bei 280 nm.

### 3.3.2 Peroxosalpetrige Säure

Die Peroxosalpetrige Säure wird für die jeweiligen Experimente im Labor selber hergestellt (Koppenol et al., 1996), kann aber mittlerweile ebenfalls über den Handel bezogen werden. Die nitrierende Wirkung wird durch die Umsetzung von Tyrosin zu 3-Nitrotyrosin nachgewiesen. Dazu wird eine sauer gepufferte Tyrosinlösung mit der stark basischen Lösung des Anions der Peroxosalpetrigen Säure gemischt. Sinkt der pH-Wert der Reaktionslösung auf einen Wert  $< 12$ , so wird durch Protonierung des Säure-Anions (ca.  $\text{pK}_a$  7) die (instabile) Peroxosalpetrige Säure freigesetzt, die nun mit Tyrosin reagieren kann. Zur Überprüfung des Ergebnisses wird wieder über eine RP-18 Säule getrennt.

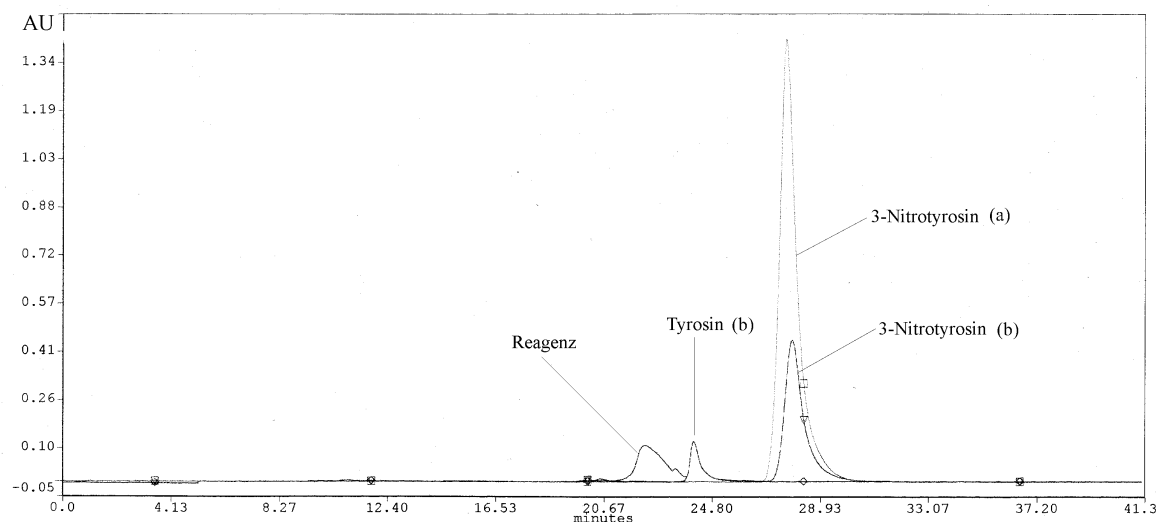


Abbildung 3.3.4: Chromatogramm von (a) 3-Nitrotyrosin (Standard) und von (b) mit HOONO behandeltem Tyrosin. Inj. 200  $\mu$ l (entsprechend 600 nmol Tyr). Isokratische Elution mit einem Puffer aus 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 3,5 und Methanol in einem Verhältnis von 70:30. Detektion bei 280 nm.

Durch Übereinanderlegen eines Chromatogramms von 3-Nitrotyrosin als Vergleichs-Standard und des Chromatogramms der Umsetzung von Tyrosin mit HOONO läßt sich anschaulich zeigen, daß die Peroxosalpetrige Säure unter geeigneten Rahmenbedingungen in der Lage ist, Tyrosin am aromatischen Kohlenstoff-Ring zu nitrieren (Abbildung 3.3.4).

### 3.3.3 Hydroxyl-Radikale

Die Hydroxyl-Radikale werden im Labor durch die Umsetzung von Wasserstoffperoxid mit  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Ionen gebildet (Fenton Reaktion, R. 16, vergl. Kapitel 2.4.1).

Werden die dabei entstehenden  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Ionen *in situ* wieder reduziert, so kann die Bildung der Hydroxyl-Radikale über längere Zeit aufrechterhalten werden (R. 17).

#### 3.3.3.1 Indirekter Nachweis der Hydroxylradikale mittels DNPH-Test

Die durch Hydroxylradikale an Proteinen verursachten Veränderungen - Hydroxylierung, (C-C)-Verknüpfung und Carbonylierung - können qualitativ über die Zunahme der Oxogruppen der jeweiligen Proteine bestimmt werden. In dem hier verwendeten Carbonylierungs-Test (Levine et al., 1994) wird eine Rinderserumalbumin (BSA) -Lösung mit einer Mischung aus  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -EDTA und Wasserstoffperoxid behandelt. Nach Ultrafiltration zum Entfernen der oxidierenden Reagenzien werden die Proben (und ebenfalls eine Probe mit nicht behandeltem

Protein) mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) umgesetzt, das mit den vorhandenen Carbonylgruppen zu den entsprechenden Hydrazonen reagiert. Nach Abtrennen des Reagenzes vom Protein durch Gelfiltration können die Hydrazone photometrisch bei 360 nm bestimmt werden. Der unterschiedliche Carbonylierungsgrad der unbehandelten bzw. der behandelten Proteine ist dabei ein Maß für den Grad der oxidativen Veränderungen. Werden zu einer Lösung von BSA (40  $\mu\text{M}$ ) und  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -EDTA (2,5 mM) in PBS unterschiedliche Mengen Wasserstoffperoxid gegeben, so findet man mit zunehmender Menge zugegebenem  $\text{H}_2\text{O}_2$  den in Tabelle 3.3.2 wiedergegebenen, steigenden Anteil Carbonylgruppen.

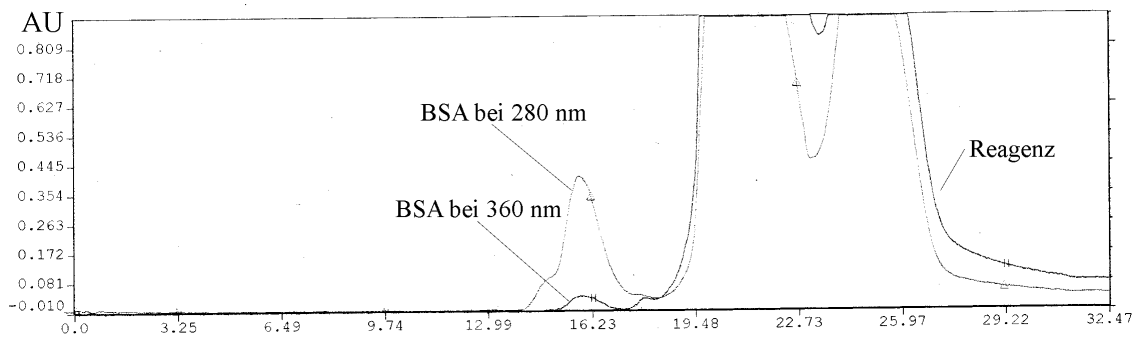
Tabelle 3.3.2: Anzahl der durch OH-Radikale veränderten BSA-Moleküle in Abhängigkeit der zugegebenen Menge Wasserstoffperoxid (Konzentration in der Reaktionslösung); der Grad der Carbonylierung wurde photometrisch mit Hilfe von DNPH bestimmt.

$\text{H}_2\text{O}_2$ [mM]	Jedes x. BSA-Molekül carbonyliert	carbonylierte Moleküle %
0,25	20	5,0
2,5	6	16,7
25	4	25,0

Tabelle 3.3.2 ist zu entnehmen, daß der Carbonylierungsgrad bei einer Konzentration von Wasserstoffperoxid in der Reaktionslösung von 2,5 mM bzw. 25 mM etwa in der selben Größenordnung liegt. In den folgenden Versuchen wird deshalb der niedrigeren Konzentration der Vorzug gegeben.

In Abbildung 3.3.5 ist die Zunahme der in einem Protein (hier BSA) vorhandenen Carbonylgruppen durch eine oxidative Behandlung mit dem Fenton Reagenz anschaulich dargestellt. Nach Behandlung mit DNPH wird das Reaktionsgemisch über eine Gelfiltrationssäule getrennt und die jeweilige UV/VIS-Absorption aufgezeichnet. In Teilabbildung a) ist die Absorption bei 360 nm (DNPH) relativ gering, allerdings nicht gleich 0; das Protein weist also wahrscheinlich auch im unbehandelten Zustand eine gewisse Anzahl Carbonylgruppen auf. Nach Behandlung mit Fenton Reagenz (Teilabbildung b) steigt die Absorption bei 360 nm dramatisch an. Durch die oxidative Behandlung kommt es also zu einer deutlichen Erhöhung der im Protein befindlichen Carbonylgruppen.

a)



b)

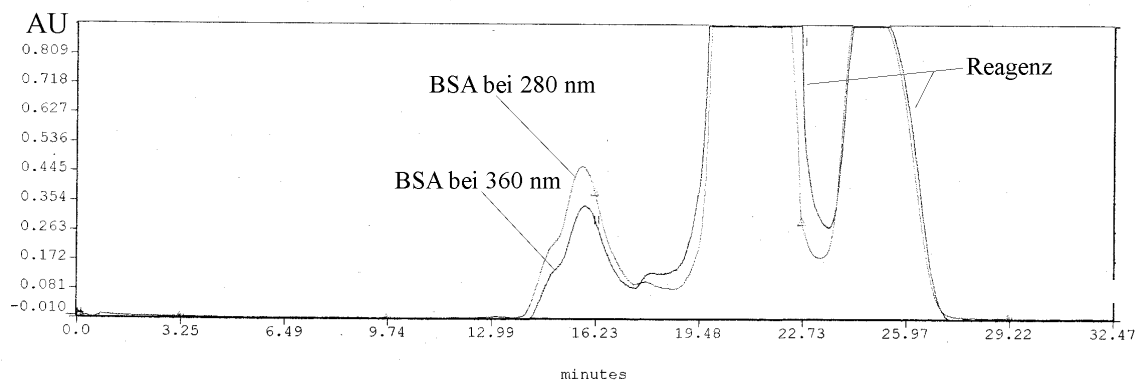


Abbildung 3.3.5: Chromatogramme der Carbonylierungs-Tests; a) ohne und b) mit Zugabe von Fenton-Reagenz. Das Hydrazon absorbiert bei 360 nm, die Absorption bei 280 nm dient der Kontrolle des Proteingehaltes.

In der Literatur finden sich Hinweise darauf (Beckman et al., 1990; Ischiropoulos und al-Mehdi, 1995; Pou et al., 1995), daß auch die Peroxosalpetrige Säure oxidierendes Potential besitzt. Zur Überprüfung wird eine Rinderserumalbumin-Lösung (150  $\mu\text{M}$ ) mit unterschiedlichen Mengen Peroxosalpetriger Säure behandelt und das Ausmaß der oxidativen Veränderungen über die jeweilige Zunahme der Oxogruppen bestimmt. Nach Ultrafiltration zum Entfernen des oxidierenden Reagenzes werden die Proben und ebenfalls eine Probe mit nicht behandeltem Protein mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zur Bestimmung der Oxogruppen durch die Bildung von Hydrazonen umgesetzt. Nach Abtrennen des DNPH vom Protein durch Gelfiltration, können die gebildeten Hydrazone photometrisch bei 360 nm bestimmt werden (Tabelle 3.3.3).

Tabelle 3.3.3: Anzahl der durch HOONO (Konzentration in der Reaktionslösung) veränderten Moleküle; DNPH-Test.

HOONO [mM]	jedes x. BSA-Molekül carbonyliert	carbonylierte Moleküle %
-	71	1,4
0,5	10	10,0
1,5	9	11,1
5	6	16,7

Auch wenn die Carbonylierungsassays keine Aussagen über die Art der an den Proteinen erfolgten Veränderungen sowie deren jeweilige Quantifizierung zulassen, so läßt sich doch folgern, daß sowohl die oxidativen Veränderungen durch das Hydroxylradikal als auch durch die Peroxosalpetrige Säure zumindest im hier festgelegten Rahmen in der gleichen Größenordnung liegen.

Werden die Ergebnisse aus insgesamt acht Experimenten zusammengefaßt, so läßt sich zeigen, daß unter den gewählten Bedingungen und im Vergleich zu den unbehandelten Rinderserumalbumin-Proben die modifizierten Proben einen etwa 5-10fach höheren Carbonylierungsgrad aufweisen (Tabelle 3.3.4).

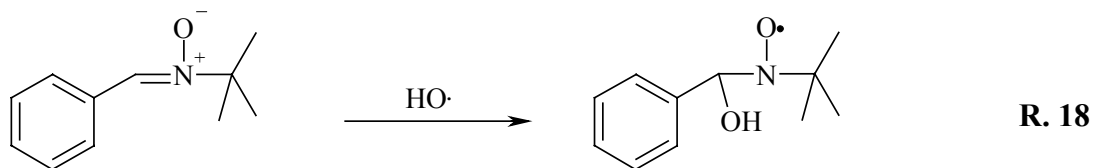
Tabelle 3.3.4: Anzahl der durch OH-Radikale oder HOONO oxidativ modifizierten BSA-Moleküle; DNPH-Test.

	jedes x. BSA-Molekül carbonyliert	carbonylierte Moleküle %
BSA unbehandelt	44 – 52	1,9 – 2,3
Fenton-System	3 – 8	12,5 - 33,3
Peroxosalpetrige Säure	5 – 9	11,1 - 20,0

### 3.3.3.2 Direkter Nachweis der Hydroxylradikale mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)

Um die Anzahl der über die Reaktion von Wasserstoffperoxid mit  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -EDTA erzeugten Hydroxylradikale zu bestimmen, wird ein ausgesuchtes Fenton-System mittels Elektronenspinresonanz (ESR) spektroskopisch untersucht. Das kurzlebige Hydroxyl-Radikal läßt sich nach seiner Generierung mit einer Spin-Falle (in diesem Fall N-t-Butyl-phenylnitron, PBN) abfangen und so in ein relativ langlebiges Radikal überführen (Reaktion 18), das bequem mittels ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden kann.

Die Messungen wurden in Quarzkapillaren durchgeführt, die Spektren werden in Form ihrer 1. Ableitung aufgenommen.



Das Spektrum in Abbildung 3.3.6 zeigt das für ein PBN-OH-Spinaddukt (Nitroxyl-Radikal) typische Muster. Wird dem Fenton-System jeweils eine Komponente nicht zugeführt (Wasserstoffperoxid, Eisen-Ionen oder PBN), so kann kein Signal beobachtet werden.



Abbildung 3.3.6: ESR-Spektrum des Spin-Adduktes PBN-OH.

Soll eine Quantifizierung des gebildeten Spin-Adduktes erfolgen, so kann dies über eine Vergleichssubstanz, hier das stabile Radikal 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Hydrat (DPPH, **21**), erfolgen. Durch die Einwaage unterschiedlicher Mengen läßt sich eine Kalibrierfunktion ermitteln, mit deren Hilfe anschließend die Zahl der entstandenen Hydroxylradikale bestimmt wird. Die DPPH-Proben wurden in einer Mischung aus Toluol und Methanol (70:30 v/v) gelöst, Abbildung 3.3.7 zeigt eines der Spektren mit dem für DPPH typischen Muster.

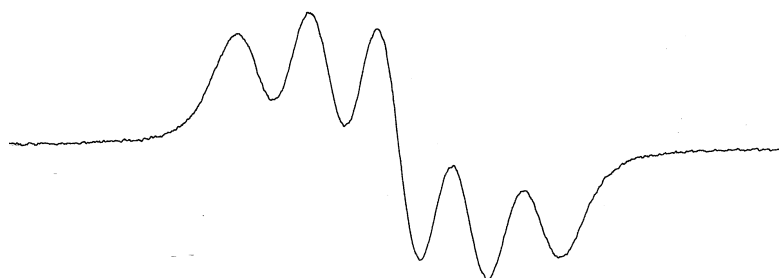


Abbildung 3.3.7: ESR-Spektrum von DPPH in Toluol/Methanol 70:30 v/v.



Über die Bestimmung der jeweiligen Signal-Intensität  $I$ , aus der man unter Einbeziehung verschiedener Geräteparameter die normierte Intensität  $I^N$  erhält (Tabelle 3.3.5, vergl. auch Kapitel 2.6.4, Gl. 1), ergibt sich die gesuchte Kalibrierfunktion.

Tabelle 3.3.5: Normierte Intensitäten der DPPH-Lösungen in Abhängigkeit der jeweiligen Konzentration.

$I^N$	[c] nmol/ml
0,024	8,3
0,295	91
2,590	1000

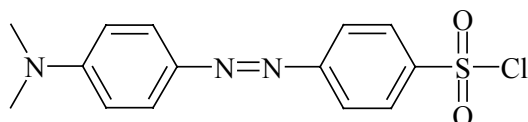
Für das Spektrum des Spin-Adduktes PBN-OH ergibt sich die normierte Intensität zu  $I^N = 0,0538$ . Die daraus errechnete Konzentration des Spinadduktes entspricht einer Konzentration der Hydroxylradikale von 16 nmol/ml. Umgerechnet ergibt sich daraus eine Teilchenzahldichte von  $9 \cdot 10^{15}$  OH-Radikalen pro ml. Die Experimente zeigen in erster Linie, daß durch das ausgewählte Fenton-System Hydroxyl-Radikale gebildet werden. Für eine weitergehende Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Radikalbildung sind weitere Versuche notwendig, bei denen mit unterschiedlichen Konzentrationen im gleichen Verhältnis gearbeitet werden muß.

### 3.4 Nachweis entzündungsbedingter Veränderungen an Proteinen

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die *in vitro* Radikal-Systeme - Hypochlorige Säure, Peroxosalpetrige Säure und Hydroxylradikal (Fenton-Reaktion) - dazu geeignet sind, die auch bei Entzündungen nachweisbaren Marker 3-Nitrotyrosin und 3-Chlorotyrosin sowie die relative Zunahme des Carbonylierungsgrades der Proteine zu generieren, soll unter Konzentration auf 3-Nitrotyrosin eine empfindliche Nachweismethode für diesen Marker etabliert werden. 3-Nitrotyrosin wird mit Hilfe der Hochauflösenden Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Vorsäulenderivatisierung und anschließender UV/VIS-Detektion nachgewiesen, wobei die Vorsäulenderivatisierung entscheidend zur Steigerung der Empfindlichkeit beiträgt. Die Entwicklung der Methode umfaßt neben der qualitativen Erfassung des Analyten insbesondere auch seine quantitative Bestimmung.

### 3.4.1 Qualitativer Nachweis von 3-Nitrotyrosin

Der Nachweis von 3-Nitrotyrosin geschieht nach Hydrolyse der zu untersuchenden Proteine und anschließender Vorsäulenderivatisierung der freien Aminosäuren. Derivatisiert wird mit 4-Dimethylaminoazobenzol-4'-sulfonylchlorid (Dabsyl-Chlorid, DABS-Cl **25**, das sowohl über seine Fluoreszenz als auch durch seine Absorption im UV/VIS photometrisch detektiert werden kann) (Lin et al., 1975; Malencik et al., 1998).



DABS-Cl **25**

Zuerst wird die Elutions-Reihenfolge der derivatisierten Aminosäuren bestimmt. Dazu wird nach Vorsäulenderivatisierung mit Dabsyl-Chlorid ein Aminosäurestandard (siehe Kapitel 2.6.8) über eine RP18-Säule mittels Gradientensystem-HPLC getrennt und mit einem UV/VIS Detektor detektiert. Danach werden schrittweise alle interessierenden Aminosäuren einzeln und anschließend zusammen mit dem Aminosäurestandard auf die Säule gegeben. Durch einen Vergleich der Retentionszeiten ergibt sich die Zuordnung der Aminosäure zum jeweiligen Signal (Abbildung 3.4.1).

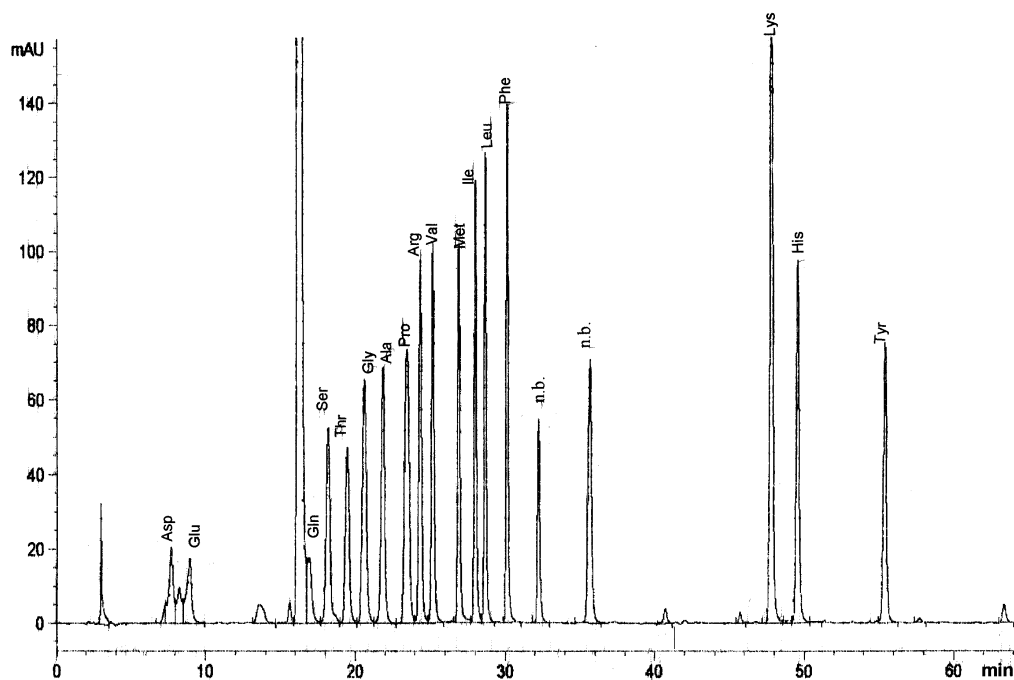


Abbildung 3.4.1: RP-HPLC – Elutions-Reihenfolge der mit DABS-Cl derivatisierten Aminosäuren (jeweils 250 pmol) des Aminosäure-Standards. Methode siehe Kapitel 2.6.8.

Auf gleiche Weise lassen sich nach Umsetzung mit Dabsyl-Chlorid auch die beiden Tyrosin-Derivate 3-Nitrotyrosin und 3-Chlorotyrosin nachweisen (Abbildung 3.4.2).

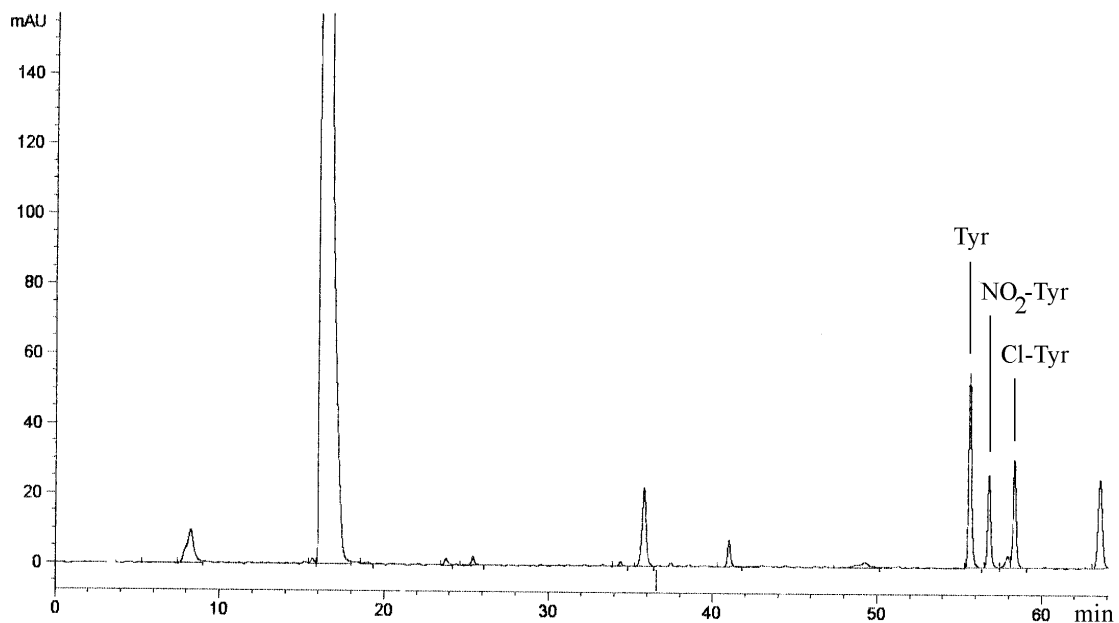


Abbildung 3.4.2: RP-HPLC – Nachweis der mit DABS-Cl derivatisierten Tyrosin-Derivate 3-Nitrotyrosin und 3-Chlorotyrosin. Methode siehe Kapitel 2.6.8.

### 3.4.2 Quantitativer Nachweis von 3-Nitrotyrosin

Für Untersuchungen zum 3-Nitrotyrosingehalt modifizierter Proteine wird Rinderserumalbumin (BSA) durch die Behandlung mit Peroxosalpetriger Säure (HOONO) nitriert. Exemplarisch sollen zwei gleichartige Versuchsreihen (Experiment 1 und 2) näher betrachtet werden, in denen zu einer gepufferten BSA-Lösung unterschiedliche Mengen Peroxosalpetrige Säure gegeben werden. Nach erfolgter Reaktion werden die Proben via Ultrafiltration aufkonzentriert und in einem bekannten Volumen aufgenommen. Die Zahl der durch die Umsetzung generierten 3-Nitrotyrosinreste lässt sich in den beiden Experimenten nun direkt photometrisch und parallel auch über HPLC mit Vorsäulenderivatisierung und UV/VIS-Detektion bestimmen.

*Direkte photometrische Bestimmung*

In Tabelle 3.4.1 sind die Absorptionswerte der direkten photometrischen Bestimmung für Experiment 1 und Experiment 2 in Abhängigkeit der zugegebenen Menge HOONO wiedergegeben. Die Konzentrationsangabe der Peroxosalpetrigen Säure bezieht sich dabei auf die Konzentration im Reaktionsvolumen.

Tabelle 3.4.1: Absorption der durch HOONO modifizierten Rinderserumalbumin-Lösungen bei 438 nm.

Zugabe HOONO [ $\mu$ l]	Experiment 1		Experiment 2	
	HOONO [mM]	AU	HOONO [mM]	AU
0	0	0	0	0
5	0,625	0,015	0,653	0,012
10	1,250	0,02	1,305	0,017
15	1,875	0,025	-	-
20	2,500	0,029	2,610	0,021
25	3,125	0,033	-	-
30	-	-	3,915	0,029
40	-	-	5,220	0,029

Der Zusammenhang zwischen den aus den Absorptionswerten über den Molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{438} = 4300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bei pH 9) (Ischiropoulos et al., 1992) berechneten Konzentrationen für 3-Nitrotyrosin und der zugegebenen Menge HOONO ist in den Abbildung 3.4.3 und 3.4.4 wiedergegeben.

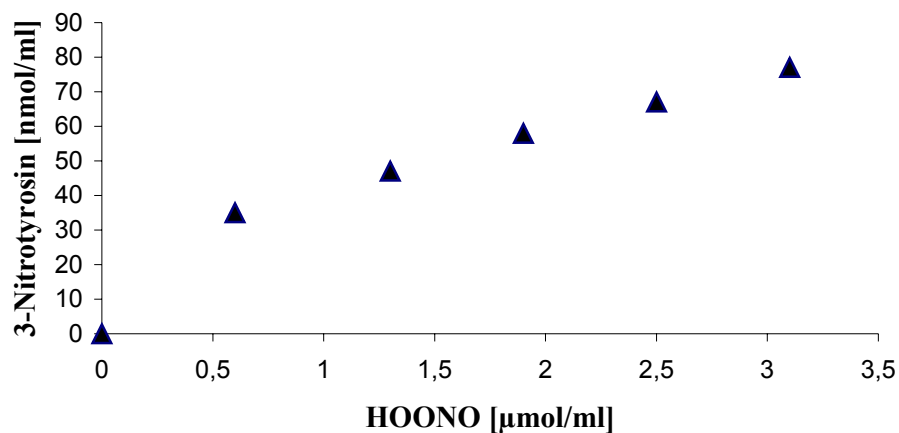


Abbildung 3.4.3: Abhängigkeit der 3-Nitrotyrosinkonzentration von der zugegebenen Menge HOONO (Experiment 1).

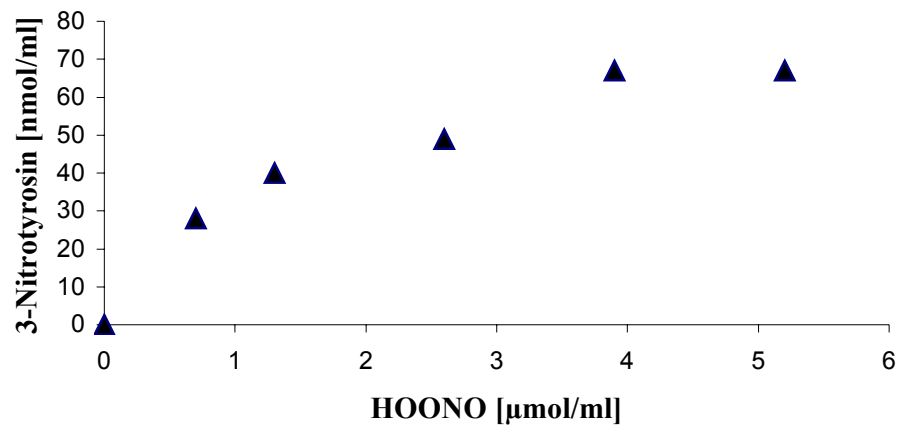


Abbildung 3.4.4: Abhängigkeit der 3-Nitrotyrosinkonzentration von der zugegebenen Menge HOONO (Experiment 2).

Dem Kurvenverlauf kann entnommen werden, daß mit zunehmender Zugabe HOONO eine kleiner werdende Anzahl Tyrosin-Reste zusätzlich modifiziert werden. Die Nitrierung verläuft also nicht linear.

Bezieht man die BSA-Konzentration in den Meßlösungen mit ein, so lassen sich schließlich die Konzentrationen für 3-Nitrotyrosin auch in Reste pro BSA-Molekül umrechnen (Tabelle 3.4.2).

Tabelle 3.4.2: Anzahl der 3-Nitrotyrosin-Reste pro BSA-Molekül (UV/VIS)

Experiment 1		Experiment 2	
HOONO [mM]	NO <sub>2</sub> -Tyr/BSA-Molekül	HOONO [mM]	NO <sub>2</sub> -Tyr/BSA-Molekül
0	0	0	0
0,625	4,6	0,653	1,8
1,250	6,2	1,305	2,6
1,875	7,8	-	-
2,500	9	2,610	3,2
3,125	10,2	-	-
-	-	3,915	4,4
-	-	5,220	4,4

Wie man der Tabelle entnehmen kann, unterscheiden sich die Ergebnisse der beiden Experimente trotz prinzipiell gleichartiger Durchführung. Der Unterschied könnte auf eine abweichende Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen bezüglich ihres Gehaltes an Übergangsmetallionen oder der Menge an gelöstem  $\text{CO}_2$  zurückzuführen sein (siehe Diskussion 4.3.2.1). Beiden Ergebnissen gemeinsam ist, daß selbst bei Zugabe der kleinsten Menge  $\text{HOONO}$  (rechnerisch) schon jedes BSA-Molekül mindestens einen 3-Nitrotyrosin-Rest enthält.

#### *Bestimmung über HPLC (UV/VIS-Detektion nach Vorsäulenderivatisierung)*

Obwohl die direkte photometrische Bestimmung durch ihre simple Handhabung besticht, kann sie nur für die Bestimmung größerer Proteinmengen (3-Nitrotyrosingehalt im nmol-Bereich) verwendet werden. Für den Nachweis kleinerer Mengen 3-Nitrotyrosin (pmol-Bereich) wird auf die Bestimmung mittels HPLC und Vorsäulenderivatisierung zurückgegriffen.

Zur Untersuchung auf den 3-Nitrotyrosingehalt von nitriertem BSA werden aus den Lösungen der zwei Nitrierungs-Experimente jeweils 10  $\mu\text{l}$  abgenommen. Die Proben werden hydrolysiert und nach ihrer Derivatisierung chromatographiert (Abbildungen 3.4.5 und 3.4.6).

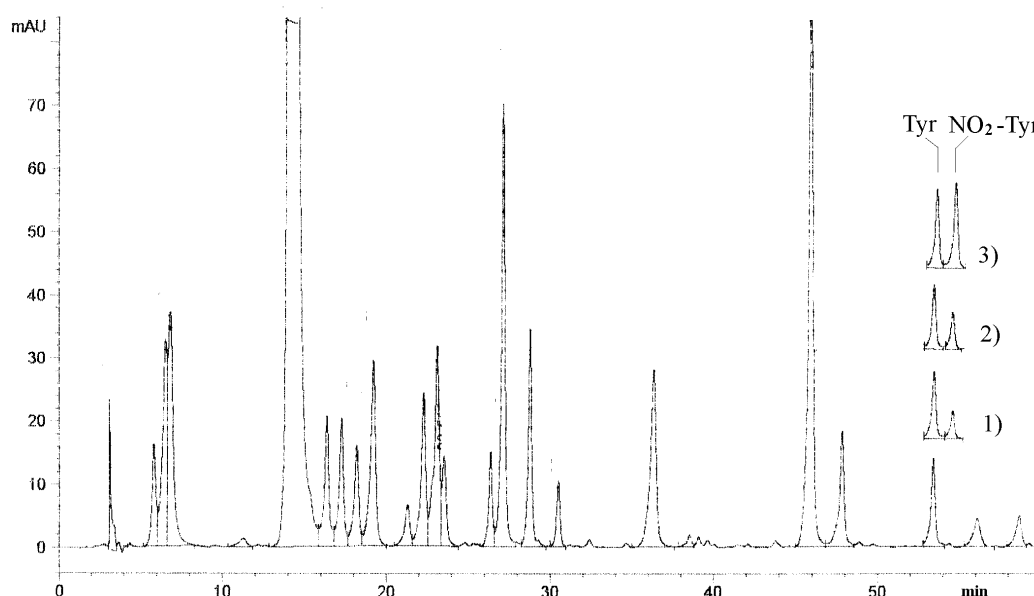


Abbildung 3.4.5: Experiment 1; Chromatographische Trennung von nitriertem und anschließend hydrolysiertem BSA. Die Nitrierung erfolgte durch Zugabe unterschiedlicher Mengen Peroxosalpetriger Säure: 1) 0,6 mM, 2) 1,3 mM und 3) 2,5 mM. Die entsprechenden Tyrosin – bzw. 3-Nitrotyrosinsignale sind gesondert dargestellt.

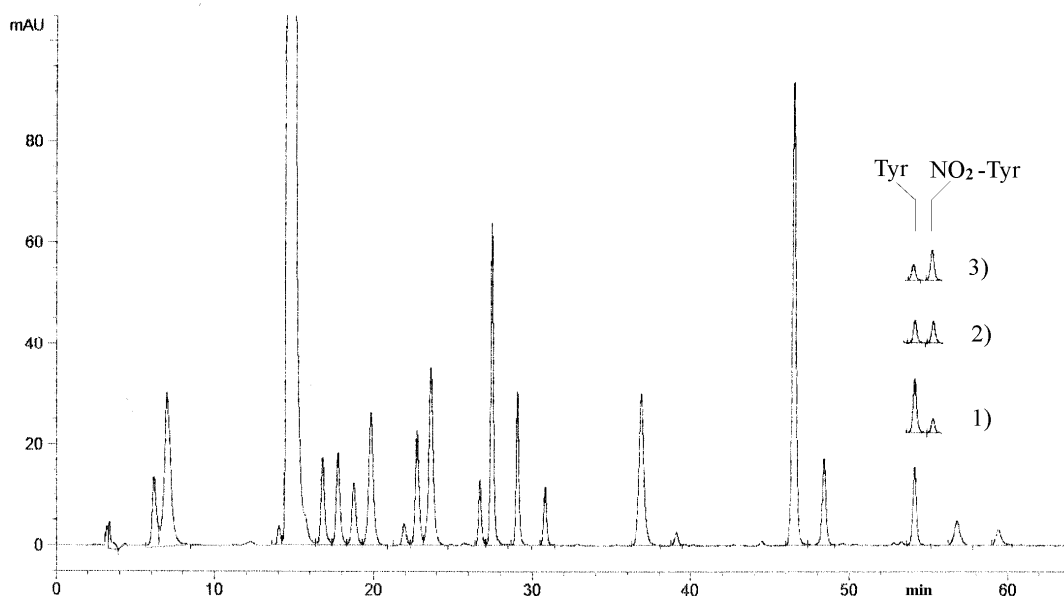


Abbildung 3.4.6: Experiment 2; Chromatographische Trennung von nitriertem und anschließend hydrolysiertem BSA. Die Nitrierung erfolgte durch Zugabe unterschiedlicher Mengen Peroxosalpetriger Säure: 1) 0,7 mM, 2) 2,6 mM und 3) 5,2 mM. Die entsprechenden Tyrosin – bzw. 3-Nitrotyrosinsignale sind gesondert dargestellt.

In Tabelle 3.4.3 sind die Signalflächen in Abhängigkeit der zugegebenen Mengen HOONO wiedergegeben. Aus den Signalflächen kann über eine Kalibrierfunktion die jeweils zugehörige Menge 3-Nitrotyrosin ermittelt werden.

Tabelle 3.4.3: Aus den Chromatogrammen der Experimente 1 und 2 ermittelte Signalflächen für 3-Nitrotyrosin ( $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ ) nach Zugabe verschiedener Mengen HOONO zu BSA.

Experiment 1		Experiment 2	
HOONO [mM]	Fläche $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ [mAU*s]	HOONO [mM]	Fläche $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ [mAU*s]
0	0	0	0
0,625	85,8	0,653	46,9
1,250	114,6	1,305	66,4
1,875	149,8	-	-
2,500	-	2,610	74,8
3,125	190,5	-	-
-	-	3,915	101,4
-	-	5,220	132,2

Zur Ermittlung der Kalibrierfunktion muß zunächst die Wiederholbarkeit der Bestimmung sowie die Hydrolysebeständigkeit des Analyten bestimmt werden. Hierzu werden drei gleiche Einwaagen 3-Nitrotyrosin<sup>30</sup> sowohl ohne als auch nach erfolgter Hydrolyse mit DABS-Cl derivatisiert. Die sechs Proben werden jeweils dreifach chromatographiert. Die aus den Chromatogrammen bestimmten Flächen stimmen innerhalb eines Experimentes besser als 3% (Wiederholbarkeit) überein. Der Mittelwert aus der Dreifachbestimmung mit Hydrolyse liegt um (ebenfalls) 3% höher als der ohne Hydrolyse bestimmte Mittelwert; dies zeigt, daß der Analyt weitgehend hydrolysestabil ist.

Zur eigentlichen Kalibration werden unterschiedliche Einwaagen NO<sub>2</sub>-Tyr hydrolysiert und anschließend mit DABS-Cl derivatisiert. Aus den Chromatogrammen kann anschließend die jeweilige Signalfläche bestimmt und den jeweiligen Stoffmengen zugeordnet werden (Tabelle 3.4.4). Durch Auftragen der Signalfläche gegen die 3-Nitrotyrosinkonzentration und Bestimmung der Steigung der Ausgleichsgeraden erhält man die Kalibrationsfunktion

$$y = 1,92 \cdot x \quad \text{mit } R^2 = 0.99.$$

Tabelle 3.4.4: Zuordnung der Signalflächen zu den jeweiligen Stoffmengen 3-Nitrotyrosin.

3-Nitrotyrosin [pmol]	Fläche [mAU*s]
10	12,1
25	40,0
50	93,8
100	195,5

Da der Nitrotyrosingehalt in einem Protein bestimmt werden soll, muß auch die Kalibration zusammen mit einem Protein durchgeführt werden. Wie oben werden unterschiedliche Mengen 3-Nitrotyrosin zusammen mit jeweils 10 µg eines Proteins hydrolysiert und anschließend derivatisiert. Aus den Chromatogrammen wird schließlich die Signalfläche für 3-Nitrotyrosin bestimmt. Für die Meerrettichperoxidase ergibt sich eine Kalibrationsfunktion von  $y = 2,185 \cdot x$ , für Rinderserumalbumin von  $y = 2,685 \cdot x$ . Versuche ohne Zugabe von 3-

<sup>30</sup> Überprüfung durch UV/VIS-Spektroskopie. Eine Überprüfung via Aminosäureanalyse (s. Abbildung 2.6.3) kann nicht erfolgen, da sich 3-Nitrotyrosin über Nachsäulenderivatisierung mit o-Phthalaldehyd (OPA) interessanterweise nicht nachweisen läßt.



Nitrotyrosin zeigen, daß die eventuell in den Proteinen schon vorhandenen Mengen 3-Nitrotyrosin zu gering sind, um mit diesem System nachgewiesen zu werden.

Es zeigt sich also, daß das Ergebnis der Kalibration von der jeweiligen Matrix abhängig ist. Der Grund für diese Abhängigkeit kann sowohl bei der Hydrolyse als auch bei der Vorsäulenderivatisierung liegen, wobei jeweils die unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung für die auftretenden Abweichungen verantwortlich sein dürfte.

Mit der Kalibrierfunktion für BSA lassen sich nun die Mengen an 3-Nitrotyrosin in Experiment 1 und Experiment 2 bestimmen und mit Hilfe der bekannten Konzentration von BSA in der Meßlösung in 3-Nitrotyrosin-Resten pro BSA-Molekül ausdrücken (Tabelle 3.4.5). Ein Vergleich von Tabelle 3.4.5 (HPLC) mit Tabelle 3.4.2 (UV/VIS) zeigt, daß beide Methoden zum selben Ergebnis führen.

Tabelle 3.4.5: Anzahl der 3-Nitrotyrosin-Reste pro BSA-Molekül (HPLC)

Experiment 1		Experiment 2	
HOONO [mM]	NO <sub>2</sub> -Tyr/BSA-Molekül	HOONO [mM]	NO <sub>2</sub> -Tyr/BSA-Molekül
0	0	0	0
0,625	4	0,653	2
1,250	6	1,305	3
1,875	7	-	-
2,500	-	2,610	4
3,125	9	-	-
-	-	3,915	5
-	-	5,220	6

### 3.4.3 ELISA zur Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in Proteinen

Zum Nachweis noch kleinerer Mengen 3-Nitrotyrosin in Proteinen wird ein indirekter Antikörpertest (ELISA, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) entwickelt, der prinzipiell allerdings nur vergleichende Aussagen zuläßt, also semiquantitative Ergebnisse liefert.

Bei einem indirekten ELISA wird ein Antigen, in unserem Fall ein durch Peroxosalpetrige Säure modifiziertes Protein, auf einer Substratoberfläche (96Well-Platte aus Polystyrol)

adsorbiert (Abbildung 3.4.7). Durch Bindung eines spezifischen Antikörpers, der gegen die 3-Nitrotyrosingruppen in den modifizierten Proteinen gerichtet ist (AK1), sowie die anschließende Bindung eines zweiten, mit einem Enzym (Meerrettichperoxidase) gekoppelten Antikörpers, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist (AK2), kann das adsorbierte Antigen nachgewiesen werden: das gekoppelte Enzym bildet aus einem zugesetzten Chromogen einen stark absorbierenden Farbstoff, der photometrisch bestimmt werden kann.

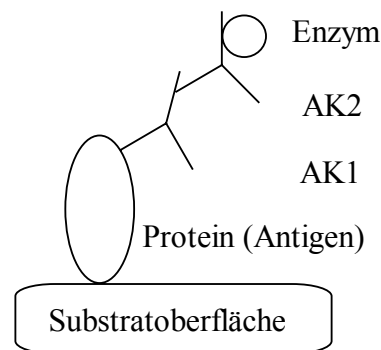


Abbildung 3.4.7: Schematische Darstellung eines indirekten ELISA; (AK = Antikörper).

Ein ELISA enthält viele Parameter, die einen Einfluß auf das Ergebnis haben und hinsichtlich einer Optimierung des Verfahrens einzeln sowie im Zusammenspiel untersucht werden müssen. Zu den wichtigsten Parameter zählt der pH-Wert der Analyt-Lösung, die jeweilige Arbeitskonzentration der beiden Antikörper, die Wahl eines geeigneten Blockpuffers sowie die Zeit, die in den jeweiligen Schritten der Proteinadsorption/ Proteinbindung zur Verfügung steht. Die Überprüfung sämtlicher Parameter und ihre optimale Abstimmung untereinander erfordert Zeit, Geduld und Erfahrung, allerdings gibt es bereits eine recht große Auswahl generell anwendbarer Protokolle, die für einen Einstieg geeignet sind.

Zuerst wird der Einfluß der Antikörperverdünnung untersucht. Dazu wird der primäre Antikörper, ein gegen 3-Nitrotyrosin gerichteter polyklonaler Antikörper (*Upstate*) sowie der ebenfalls polyklonale sekundäre Antikörper in jeweils zwei verschiedenen Verdünnungen verwendet. Um auszuschließen, daß die für BSA bestimmten Absorptionswerte durch im unbehandelten Protein vorhandene 3-Nitrotyrosingruppen verursacht werden, wird außerdem durch Dithionit reduziertes BSA, in dem alle eventuell vorhandenen 3-Nitrotyrosingruppen zu 3-Aminotyrosingruppen reduziert wurden, verwendet (Tabelle 3.4.6).

Tabelle 3.4.6: Einfluß der Antikörperverdünnung; untersucht wurden Lösungen mit reduziertem BSA, unbehandeltem BSA sowie BSA, das mit 250  $\mu\text{M}$  HOONO bzw. 750  $\mu\text{M}$  HOONO behandelt wurde. Die Werte stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar.

Verdünnung		AU			
AK1	AK2	BSA' (red.)	BSA	BSA' (250 $\mu\text{M}$ HOONO)	BSA' (750 $\mu\text{M}$ HOONO)
'1:1000	'1:1000	0,698	0,631	2,971	2,860
'1:1000	'1:2000	0,387	0,522	2,589	2,502
'1:2000	'1:1000	0,414	0,509	2,857	2,752
'1:2000	'1:2000	0,326	0,519	2,366	2,392

Werden die Daten aus Tabelle 3.4.6 graphisch aufbereitet, so kann der Abbildung entnommen werden, daß die Variation der Antikörperkonzentration im gewählten Bereich keinen großen Einfluß hat: die über alle Konzentrationskombinationen gemittelten Absorptionswerte weisen lediglich geringe Unterschiede auf; die Variabilität der Werte ist als Fehlerbalken dargestellt (Abbildung 3.4.8).

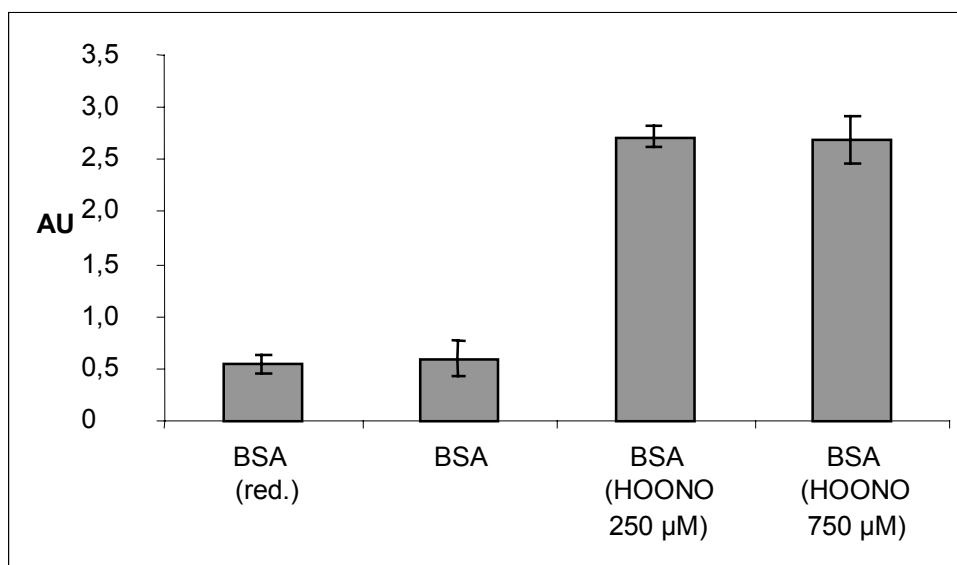


Abbildung 3.4.8: Absorptionswerte des ELISA gegen 3-Nitrotyrosin; die jeweiligen Werte wurden über alle Konzentrationskombinationen gemittelt, die Variabilität ist als Fehlerbalken dargestellt.

Der Abbildung kann außerdem entnommen werden, daß die Absorptionswerte für die modifizierten Proteine etwa vierfach gegenüber den Absorptionswerten des unbehandelten bzw. reduzierten Proteins erhöht sind. Interessant ist hierbei, daß durch die Modifizierung mit der dreifachen Menge HOONO keine höheren Absorptionswerte resultieren.

Der Unterschied zwischen BSA und BSA red. ist überraschend gering. Der geringe Unterschied könnte für auch im unbehandelten Protein vorhandene 3-Nitrotyrosin-Gruppen stehen, allerdings ist die unspezifische Adsorption der Antikörper an BSA so groß, daß eine diesbezügliche Beurteilung nicht sicher möglich ist.

In Kapitel 3.4.2 wurde gezeigt, daß BSA mit mindestens 600  $\mu\text{M}$  HOONO umgesetzt werden muß, damit mit Hilfe der HPLC noch 3-Nitrotyrosin detektiert werden kann. Diese bezüglich der Umsetzung untere Grenze erweist sich für den ELISA als obere Grenze, da derart modifizierte Proben zu einer Absorption führen, die keinen Unterschied zu einem noch stärker modifizierten Protein erkennen lassen. Wird die Derivatisierung der Proteine allerdings durch mit 0,3 N NaOH verdünnte Lösungen HOONO vorgenommen, so ist eine klare Unterscheidung des Derivatisierungsgrades möglich (Abbildung 3.4.9). Daraus folgt, daß die durch eine Konzentration von etwa 2,5  $\mu\text{M}$  HOONO an den Proteinen verursachten Veränderungen mit Hilfe des hier verwendeten ELISA noch nachgewiesen werden können.

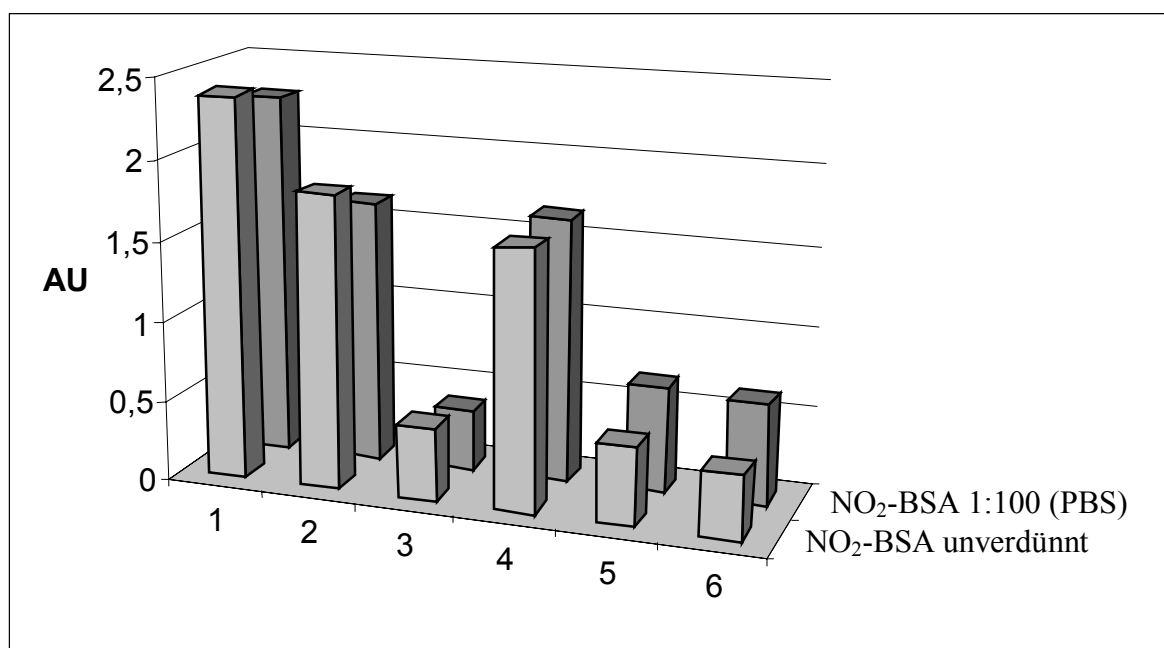


Abbildung 3.4.9: Einfluß unterschiedlich konzentrierter Lösungen HOONO auf die Derivatisierung zweier unterschiedlich konzentrierter BSA-Lösungen. Außerdem dargestellt die Absorptionswerte für die mit PBS (1:100) verdünnten Analytlösungen;

1 mg/ml BSA:	(1) 250 $\mu\text{M}$ HOONO	(2) 25 $\mu\text{M}$ HOONO	(3) 2,5 $\mu\text{M}$ HOONO
10 mg/ml BSA:	(4) 250 $\mu\text{M}$ HOONO	(5) 25 $\mu\text{M}$ HOONO	(6) 2,5 $\mu\text{M}$ HOONO

Abbildung 3.4.9 kann man entnehmen, daß die Absorptionswerte für 2,5 µM HOONO im Bereich der unbehandelten Proteine liegen: die Absorptionswerte für unbehandeltes BSA liegen bei  $0,306 \pm 0,032$  AU, für das im Block-Puffer verwendete MLK (Milchpulver, fettfrei) bei  $0,286 \pm 0,093$  AU. Durch weitere Optimierung des ELISA und Auffinden eines besser geeigneten Block-Puffers, der einen geringeren Hintergrund liefert, sollte zukünftig auch der Nachweis von Derivaten aus Umsetzungen mit noch kleineren Konzentrationen HOONO möglich sein.

## 4 Diskussion und Ausblick

### 4.1 Immobilisierung von Proteinen an Materialien für den Hartgewebekontakt

Durch die Anbindung des Modellproteins Meerrettichperoxidase (HRP) an die Titanlegierung TiAl6V4 mittels  $\gamma$ -Aminopropyl-Triethoxysilan (APTES) und Glutaraldehyd (GDA) konnte gezeigt werden, daß auf einer Fläche von 1  $\mu\text{m}^2$  etwa 60 Proteinmoleküle mittlerer Größe kovalent gebunden werden können. Da das Ziel einer Oberflächenmodifizierung oft die verbesserte Zelladhäsion ist, stehen somit selbst für kleine Zellen weit mehr als 2000 Bindungsstellen zur Verfügung. Aber auch die Polysiloxanschicht alleine kann zu einer Verbesserung der Zelladhäsion führen, da sie wichtige Parameter wie Oberflächenspannung, Polarität/Ladung (Maroudas, 1975) und Benetzbarkeit beeinflusst (Liefeyth et al., 1998; Sauberlich et al., 1998). Die Anbindung über  $\gamma$ -Aminopropyl-Triethoxysilan und Glutaraldehyd hat den Vorteil, daß sie schnell, einfach und schonend durchzuführen ist (Puleo und Nanci, 1999), allerdings sind auch andere Vorgehensweisen denkbar.

Die Reinigung der Oberfläche mit einer Mischung aus Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid hat sich gegenüber anderen Methoden als am besten geeignet erwiesen (Nanci et al., 1998), die Oxidschichtdicke sollte danach mindestens 80 Å stark sein, die Zahl der auf der Oberfläche befindlichen Hydroxylgruppen sollte sich in der Größenordnung von etwa 50 OH/10 nm<sup>2</sup> bewegen (Simmons und Beard, 1987). Die Reaktivität der Hydroxylgruppen ist im Allgemeinen gering, so daß sie für eine Kopplung mit Proteinen oder Peptiden entweder durch das Einführen stärker nukleophiler Zentren oder aber durch Erzeugung oder das Einführen elektrophiler Zentren aktiviert werden müssen. Letzteres erfordert meist harsche Reaktionsbedingungen. Die Anbindung über Alkoxysilane bietet neben schonenden Reaktionsbedingungen den Vorteil, daß diese gleichzeitig als 'Spacer' fungieren und so den Proteinen nach Anbindung einen gewissen Schutz vor konformellen Änderungen (Adsorption) bieten (Nanci et al., 1998). Werden spaltbare 'Spacer-Moleküle' verwendet, so bieten diese zudem den Vorteil, daß gebundene Moleküle durch hydrolytische oder enzymatische Reaktionen mit einer definierten Kinetik freigesetzt werden können (Horton und Swaisgood, 1987).

Prinzipiell kommen neben  $\gamma$ -Aminopropyl-Triethoxysilan auch andere Alkoxysilane in Frage, beispielsweise Mercaptopropyl-Trimethoxysilan oder Chloropropyl-Triethoxysilan, die neben einer größeren Reaktivität allerdings auch eine geringere Stabilität aufweisen.

Die Bindung von  $\gamma$ -Aminopropyl-Triethoxysilan über die Reaktion mit den Hydroxylgruppen der Substratoberfläche kann durch Erhitzen in Toluol oder bei Raumtemperatur in Aceton gelöst bzw. als wäßrige Lösung erfolgen. Durch die Anbindung in organischem Lösungsmittel wird eine größere Anzahl Aminogruppen eingeführt, allerdings fällt die Beständigkeit dieser Gruppen gegenüber den in wäßriger Lösung eingeführten Gruppen geringer aus. Dies wird darauf zurückgeführt, daß sich gerade bei kleineren APTES-Konzentrationen in wäßriger Lösung ein wohlgeordneter Monolayer ausbildet ( $20\text{-}30 \text{ NH}_2/10 \text{ nm}^2$ ) (Weetall, 1976). Wie sich in der vorliegenden Arbeit gezeigt hat, ist die Zahl der Aminogruppen bei der Anbindung in siedendem Toluol abhängig von der Verweildauer in der abkühlenden Reaktionslösung. Man könnte nun auf die Idee kommen, auf diese Weise die Anzahl der auf der Oberfläche vorhandenen Aminogruppen steuern zu können. Allerdings ist davon auszugehen, daß die durch lange Standzeiten entstehenden Schichten relativ inhomogen und nur wenig geordnet sind, so daß sicherlich die direkte Entnahme (nach 10 Minuten) vorzuziehen ist.

Die zur Anbindung von Proteinmolekülen notwendige Aktivierung des Alkylamins gelingt am Einfachsten über Glutardialdehyd, kann allerdings auch auf anderem Wege erfolgen, beispielsweise über die Reaktion mit einem Triazin, der Überführung in ein Isothiocyanat, ein Carboxylderivat (Aktivester) oder ein Arylamin (Azokopplung) (Weetall, 1970).

In unseren Experimenten zur Proteinanbindung mit Glutardialdehyd ist keine Korrelation zwischen der Anzahl der Aminogruppen auf der Oberfläche und der Zahl gebundener Proteinmoleküle feststellbar: es werden durch das Vorliegen einer größeren Anzahl Aminogruppen nicht mehr Proteinmoleküle gebunden. Das bedeutet auch, daß der Entnahmezeitpunkt nicht kritisch für die Proteinanbindung ist.

Bei seinen Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der Stabilität von an TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> gebundenen Enzymen in Kulturmedium stellt Puleo (Puleo, 1997) fest, daß sowohl die Konzentration von APTES in der Reaktionslösung als auch das Medium der Reaktionslösung einen gewissen Einfluß hat: er findet je nach Reaktionsbedingung zwischen 21 und 46 Aminogruppen pro  $10 \text{ nm}^2$ . Diese Unterschiede wirken sich allerdings ebenso wie in unseren Experimenten kaum auf die zu erzielende Anfangs-Aktivität aus.

Besonderes Interesse verdienen die von ihm im Folgenden gefundenen Ergebnisse, die zeigen, daß sich die kovalent gebundenen Proteine schon nach etwa acht Stunden zu einem Großteil vom Substrat lösen. Im Kulturmedium gehen innerhalb der ersten 8 h etwa 80 % dieser

anfänglichen Aktivität verloren, die Restaktivität innerhalb weiterer 40 h. Diese Ergebnisse hängen stark vom Substrat ab, eine gleichartig behandelte Co-Cr-Mo-Legierung verliert in den ersten 8 h lediglich 50% der anfänglichen Aktivität, die Restaktivität bleibt über 96h hinaus erhalten. Wird das Enzym zum Vergleich nur adsorptiv gebunden, so geht die Aktivität bei beiden Substraten schon nach 8 Stunden komplett verloren. Da bekannt ist, daß TiAl6V4 eine große Oberflächendynamik aufweist liegt der Schluß nahe, daß der Verlust an Aktivität mit dem Verlust an kovalent gebundenem Enzym verknüpft ist. Tatsächlich sinkt in seinen Untersuchungen die Anzahl der auf der Oberfläche nachweisbaren Aminogruppen in den ersten 8 h um 70%, nach 48-72 h sind keine Aminogruppen mehr nachweisbar. Es scheint also, daß die schwache Ti-O-Si-Bindung maßgeblich für die Zeitspanne der oberflächennahen Aktivität verantwortlich ist – nach spätestens zwei Tagen haben sich sämtliche kovalenten Bindungen gelöst (Puleo, 1997).<sup>31</sup> Für die von uns in Zukunft geplanten Untersuchungen spielt der relativ rasche Verlust der kovalenten Bindung keine Rolle, sind jedoch Untersuchungen *in vivo* oder mit Zellkulturen geplant, so sollten diese Ergebnisse durch eine Überprüfung berücksichtigt werden.

## **4.2 Immobilisierung von Proteinen an Materialien für den Weichgewebekontakt**

Die Untersuchungen zur Anbindung an Materialien für Weichgewebekontakt wurden an mit Polyacrylsäure gepfropften PDLLA-Folien durchgeführt. Aus der Bestimmung der Zahl der durch die Pfropfung auf der Oberfläche erhaltenen Carboxylgruppen mit Hilfe des kationischen Farbstoffes Toluidinblau O 22 (Thissen, 1999), läßt sich eine Belegungsdichte von 3000 bis 30000 Carboxylgruppen pro 10 nm<sup>2</sup> ableiten. Aus Angaben zur Bindungsdichte eines Polyacrylsäure-Propfpolymers auf einer Polysulfonmembran (Ulbricht und Riedel, 1998) läßt sich weiter ableiten, daß im Mittel etwa 10 Pfropf-Polymerketten auf einer Fläche von 10 nm<sup>2</sup> gebunden sind. Zusammen mit der durch Thissen mit dem stabilen Radikal 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Hydrat bestimmten Anzahl der durch die Plasmabehandlung auf der PDLLA-Oberfläche erhaltenen Peroxide (52 Peroxide/10 nm<sup>2</sup>) ergibt sich, daß etwa jedes 5. Peroxid eine Polymerisationsreaktion einleitet (Thissen, 1999).

---

<sup>31</sup> Diese Ergebnisse werden in der Literatur nicht reflektiert und auch Puleo hat keine weiteren Arbeiten in dieser Richtung veröffentlicht.



Aus den Angaben läßt sich außerdem die durchschnittliche Länge der Polymer-Ketten abschätzen, die in Abhängigkeit der Pfropf-Bedingungen zwischen 100 und 900 nm beträgt. Es kann weiter davon ausgegangen werden, daß die Copolymerketten nicht gleich lang sind, so daß einige Ketten etwa 1000 nm oder länger sind.

Unsere Experimente zur Anbindung von Proteinen an die gepfropfte PDLLA-Folie mit Aktivierung der Carboxylgruppen (EDC/NHS) bzw. ohne deren Aktivierung zeigen, daß die Menge adsorbierten Proteins beträchtlich ist, obwohl die Polyacrylsäure-Ketten ein Hydrogel bilden, das ein Eindringen von Protein erschweren sollte. Allerdings führen wahrscheinlich die starken elektrostatischen Wechselwirkungen mit den geladenen Carboxylgruppen dazu, daß das Protein trotzdem in großer Menge in das Hydrogel gelangt. Weiter zeigt sich, daß die Aktivität unseres an die Folie gebundenen Modellproteins, der Meerrettichperoxidase (HRP), nur etwa 0,1 % des über die Aminosäureanalyse ermittelten Wertes der Mengen gebundenen Proteins entspricht. Dies könnte eventuell durch eine Mehrfachbindung der HRP-Moleküle an die im Hydrogel zahlreich vorhandenen Carboxylgruppen oder eine Ladungsbedingte Retention der Chromogenmoleküle bedingt sein. Ähnliche Beobachtungen konnten auch (Valuev et al., 1998) und (Ulbricht und Riedel, 1998) machen. Für die Meerrettichperoxidase läßt sich anhand der Aminosäureanalysedaten abschätzen, daß etwa 50 Moleküle in einer Art Multilayer übereinanderliegen, im Falle von Interleukin-6 etwa 40 - 70 Moleküle. Diese Anordnung könnte die zu beobachtende verminderte Aktivität (s.o.) mitverursachen. Im Falle von Fibronectin (Dimer) liegen immerhin noch 5 Moleküle übereinander. Die Bindung der Peptide mit 2000 Molekülen pro  $10 \text{ nm}^2$  führt sogar zu einigen hundert übereinanderliegenden Molekülen. Selbst diese große Anzahl Moleküle kann in der aus den langen Pfropfcopolymerketten gebildeten Hydrogelschicht noch leicht untergebracht werden.

Die Untersuchung zur parallelen Anbindung eines Dipeptides und eines Proteins zeigt, daß in Abhängigkeit der Zugabereihenfolge die größeren Proteinmoleküle eine dichte Schicht bilden können, die darunterliegende Carboxylgruppen vor der Reaktion mit dem kleineren Peptid abschirmt. Hinweise auf diese an der Oberfläche des Hydrogels gebildete dichte Proteinschicht erhält man auch aus X-Ray Photoelektron-Spektren von mit Polyacrylsäure gepfropften PDLLA-Folien, die in ähnlicher Weise mit Fibronectin anstelle von BSA behandelt wurden (Thissen, 1999). Im Falle der unbehandelten, proteinfreien gepfropften poly-D,L-Lactidfolie erhält man einen Wert von 0,6 % N, der durch Verunreinigungen zustande kommt. Dieser Wert steigt für die gepfropfte poly-D,L-Lactidfolie auf 11,5 bzw. 11,7 % N in Abwesenheit oder aber mit EDC/NHS an. Beide Werte nähern sich dem

theoretischen Wert von 15 % N für eine dichte Fibronectin-Schicht an, die selbst in Abwesenheit von EDC/NHS gebildet wird.

Die untersuchte Pfropf-Copolymerschicht eignet sich demnach gut, um große Mengen Protein sowohl adsorptiv als auch kovalent zu binden. Je nach Anwendungsziel kann die große Zahl der Carboxylgruppen außerdem dazu verwendet werden, die Eigenschaften der Hydrogelschicht in Abhängigkeit des pH-Wertes zu nutzen. Soll die Plasmabehandlung allerdings ausschließlich der Funktionalisierung der PDLLA-Folie dienen, so könnte durch Verwendung einer weniger konzentrierten Acrylsäurelösung (Ulbricht und Riedel, 1998) bzw. durch Verwendung eines mit Polyethylenglykol (PEG) modifizierten Acrylsäure-Monomers eine Pfropfschicht geschaffen werden, die weit weniger Protein adsorptiv bindet.

### **4.3 Nachweis radikalinduzierter Modifizierungen**

Durch die bei entzündlichen Prozessen auftretenden Reaktiven Molekül-Spezies kommt es zur Modifizierung von DNA, Lipiden und Proteinen. Bezüglich der Veränderungen an Proteinen und Peptiden zeigt sich, daß die Zahl der aktiven Spezies begrenzt ist und die daraus resultierenden chemischen Veränderungen einem der wenigen prinzipiellen Reaktionsschemata zugeordnet werden können. Die Mechanismen dieser Umsetzungen, besonders aber das Zusammenspiel sowie die Regulierung und Bildung der einzelnen ROS/RNS sind allerdings noch Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Oft laufen diese Reaktionen über Radikalmechanismen ab und führen in den Proteinen durch Oxidation zu Fragmentierung, Hydroxylierung, der Bildung von Oxogruppen sowie zu C-C-Verknüpfungen. Einige spezifische Reaktionen mit aromatischen Aminosäureresten führen zur Bildung von Hydroxy-, Chloro- oder Nitro-Derivaten. Da die meisten ROS/RNS oxidierend wirken, geben die Oxidationsprodukte nur selten Auskunft über das oxidierende Agens. Anders verhält es sich mit den Chloro- oder Nitroderivaten, die klar einer kleinen Gruppe reaktiver Spezies zugeordnet werden können. Gerade das in den letzten Jahren gestiegene Interesse an NO hat auch ein wachsendes Interesse an der Bestimmung von 3-Nitrotyrosin als Marker dieser Spezies nach sich gezogen.

### 4.3.1 Carbonylierung

Eine gängige Methode zur Untersuchung oxidativ modifizierter Proteine ist die Bestimmung ihres Carbonylierungsgrades. Eine Übersicht über bisher verwendete Carbonylierungs-Assays findet sich bei (Levine et al., 1994). Die Untersuchung des Carbonylierungsgrades eignet sich gut für einen Vergleich unterschiedlicher Proben, die Ergebnisse lassen sich allerdings schlecht quantifizieren, da die durch Oxidation entstandenen Oxogruppen mehreren oxidierenden Spezies zugeschrieben werden können, die zudem noch eine Vielzahl anderer Modifikationen verursachen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente durchgeführt, die den Grad der Carbonylierung in Rinderserumalbumin (BSA) nach Reaktion mit Fenton-Reagenz oder aber Peroxosalpetriger Säure photometrisch untersuchen. Die beiden Experimente lassen sich nur schlecht miteinander vergleichen, erfüllen allerdings ihren Zweck, das modifizierende Potential der oxidierenden Reagenzien aufzuzeigen. Die Ergebnisse zeigen, daß schon 1,4 % der nichtmodifizierten BSA-Moleküle statistisch eine Oxogruppe tragen. Nach Reaktion mit unserem Fenton-Reagenz erhöht sich dieser Prozentsatz auf 5%. Wenn wir davon ausgehen, daß für diese Veränderungen OH-Radikale verantwortlich sind, so hätte unter Einbeziehung der Ergebnisse des ESR-Experiments etwa jedes 8. OH-Radikal zur Bildung einer Oxogruppe geführt. Für eine weitergehende Aussage muß allerdings die Abhängigkeit der OH-Radikalbildung von der Konzentration der chelatisierten Eisen-Ionen noch näher untersucht werden.

Nach der Reaktion von BSA mit Peroxosalpetriger Säure im Verhältnis 1:3 ( $\mu\text{M}$ ) tragen statistisch etwa 10% der BSA-Moleküle eine Oxogruppe. Ischiropoulos et al. (Ischiropoulos und al-Mehdi, 1995) finden bei der Reaktion von BSA mit HOONO im Verhältnis 1:10, daß etwa 50% der BSA-Moleküle statistisch eine Oxogruppe tragen. Im Vergleich zu unserem Experiment führt die etwa dreifache Menge HOONO zu einer 5fach größeren Anzahl Oxogruppen. Da die oxidierenden bzw. nitrierenden Eigenschaften der Peroxosalpetrigen Säure entscheidend von der Zusammensetzung des Reaktionsmediums abhängen (s. 4.2.3.1), überraschen die unterschiedlichen Werte nicht. Für zukünftige Experimente wäre allerdings die parallele Bestimmung der Nitrierung bzw. das Verhältnis Carbonylierung/Nitrierung von besonderem Interesse.

Anstelle des photometrischen Ansatzes verwenden Buss et al. (Buss et al., 1997) einen immunologischen Test zur Detektion und quantifizierung der Carbonyle in oxidiertem BSA. Sie können zeigen, daß ihre Ergebnisse gut mit dem parallel durchgeführten kolorimetrischen

Nachweis korrelieren. Die Kalibration erfolgt mit oxidiertem BSA (HOCl), das anteilig mit reduziertem BSA vermischt wird. Interessanterweise zeigt sich dabei ein erheblicher Einfluß der Oxidationsmethode auf das Ergebnis (wurde auch schon für kolorimetrische Tests gefunden (Lyras et al., 1996)). Neben der hohen Empfindlichkeit und der großen Spezifität bietet der ELISA insbesondere den Vorteil, mit kleinen Proteinmengen auszukommen (60 µg anstelle 10 mg für eine kolorimetrische Bestimmung (Quinlan et al., 1994)).

#### 4.3.2 3-Nitrotyrosin

Die Anwesenheit von NO in biologischen Systemen führt zur Bildung reaktiver Stickstoff Spezies (RNS), die mit Tyrosinresten in Proteinen zu 3-Nitrotyrosin reagieren. Für die Nitrierung wird vor allem die Peroxosalpetrige Säure<sup>32</sup> (HOONO) verantwortlich gemacht, deren direkter Nachweis allerdings relativ schwierig ist. 3-Nitrotyrosin wird deshalb als Marker für die allgemeine RNS Produktion, insbesondere auch HOONO, in verschiedenen Geweben verwendet (Herce-Pagliai et al., 1998). Die Geschwindigkeit der Reaktion von HOONO mit freiem oder proteingebundenem Tyrosin zu dem stabilen Endprodukt 3-Nitrotyrosin wird durch Übergangsmetallionen/Metalloproteine und  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  erhöht. Die Nitrierung verläuft entweder über ein ionisches Intermediat (Crow und Ischiropoulos, 1996; Pryor und Squadrito, 1995) oder aber über radikalische Mechanismen (Beckman et al., 1992; Ischiropoulos et al., 1992; van der Vliet et al., 1996) und (Halliwell, 1997). Auch Nitrit, das Endprodukt des NO-Metabolismus, kann zur Nitrierung von Tyrosin beitragen: einmal über die Reaktion mit HOCl unter Bildung von Nitryl-Chlorid (Eiserich et al., 1996; Eiserich et al., 1998; van der Vliet et al., 1997) oder aber durch die Bildung von  $\text{NO}_2$  durch Peroxidasen in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (Roberts et al., 1992).

Zur Untersuchung im Labor läßt sich die Peroxosalpetrige Säure auf unterschiedlichem Wege darstellen (Uppu et al., 1996a), beispielsweise über die Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Salpetriger Säure (Beckman, 1994; Hughes und Nicklin, 1970), von Azid-Ionen mit Ozon (Pryor and Squadrito, 1995) oder in einem Zweiphasensystem mit Isoamylnitrit und einer alkalischen Wasserstoffperoxidlösung (Uppu und Pryor, 1996). Eine Besonderheit stellt die Reaktion von NO mit Tetramethylammonium Superoxid in flüssigem Ammoniak dar (Bohle

---

<sup>32</sup> Peroxosalpetrige Säure (HOONO) und das bei physiologischem pH-Wert vorliegende Peroxonitrit ( $\text{ONOO}^-$ , pKa 6,8; Pryor und Squadrito, 1995) werden in dieser Arbeit synonym verwendet.

et al., 1994), die zu einem kristallinen Produkt führt. Neben der präparativen Darstellung kann HOONO auch *in situ* erzeugt werden: entweder durch unabhängige, kontinuierliche Bildung von Superoxid und NO unter Verwendung der Xanthinoxidase sowie eines NO-Donors (Rubbo et al., 1994); oder durch simultane Bildung von NO und Superoxid aus einer einzigen Substanz (Hogg et al., 1992).

Am wenigsten Aufwand bereitet die Darstellung aus Salpetriger Säure und Wasserstoffperoxid, weshalb diese Methode von uns verwendet wurde. Die so gewonnenen HOONO-Lösungen können durch Ausfrieren weiter konzentriert werden und enthalten als Hauptverunreinigung Nitrit und Wasserstoffperoxid. Größere Mengen Nitrit bereiten erst im Säuren (< pH 3) ein Problem. Halliwell und Gutteridge (Halliwell und Gutteridge, 1999) konnten zwar zeigen, daß Wasserstoffperoxid im Bereich von 10 – 100 µM zytotoxisch wirkt, bei Konzentrationen von bis zu 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigt sich allerdings keine direkte Auswirkung auf Proteine (Visser und Winterbourn, 1991b). Eher wirkt sich der Wasserstoffperoxidgehalt auf die Lagerung von HOONO aus, da beide miteinander zu Sauerstoff abreagieren können (Alvarez et al., 1995). Sollte Wasserstoffperoxid dennoch stören, etwa weil es mit Spuren von Übergangsmetallen Hydroxylradikale bildet, so kann es durch Passage über eine kurze Säule mit MnO<sub>2</sub> beseitigt werden (Beckman et al., 1990). Soll gänzlich wasserstoffperoxidfrei gearbeitet werden, so ist die Azid-Ozon-Methode am besten geeignet. Stört Azid, so bietet sich die Darstellung aus Isoamyl an.

#### 4.3.2.1 Photometrische Bestimmung

Für die qualitative und quantitative Bestimmung von 3-Nitrotyrosin stehen inzwischen zahlreiche Methoden zur Verfügung: neben HPLC in Kombination mit verschiedenen Detektionssystemen auch immunologische Techniken oder Gaschromatographie mit MS-Detektion. 3-Nitrotyrosin läßt sich allerdings auch direkt photometrisch bestimmen. Bei pH 3,5 weisen Tyrosin sowie 3-Nitrotyrosin ein Absorptionsmaximum bei 280 nm auf, 3-Nitrotyrosin zeigt ein weiteres Absorptionsmaximum bei 365 nm (pH 5) bzw. 430 nm (pH 9,5). Die Methode funktioniert sowohl für freies 3-Nitrotyrosin als auch für 3-Nitrotyrosyl-Reste in Proteinen und Peptiden, ihre Verwendbarkeit ist allerdings durch die eher geringe Empfindlichkeit sowie die Notwendigkeit relativ reiner Proben eingeschränkt.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der in dieser Arbeit parallel vorgestellten Experimente 1 und 2 überraschen auf den ersten Blick, da die Experimente prinzipiell gleichartig

durchgeführt wurden. Allerdings wurden zwei unterschiedliche Reaktionslösungen verwendet, die eventuell über einen unterschiedlichen Gehalt an katalytisch aktiven Übergangsmetall-Ionen (Beckman et al., 1992; Ischiropoulos et al., 1992) oder an  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  (Lemercier et al., 1997; Uppu et al., 1996b; Yermilov et al., 1996) verfügen. Beide Spezies begünstigen eine Nitrierung.

Im Vergleich zu unserem Experiment verwendet Ischiropoulos (Ischiropoulos und al-Mehdi, 1995) in seiner Untersuchung bei etwa gleicher Zugabemenge HOONO ca. die achtfache Menge BSA. Werden bei uns 2-5 3-Nitrotyrosinreste pro BSA gefunden (10-25%), so sind es bei Ischiropoulos nur 0,6 3-Nitrotyrosinreste pro BSA (3,2%). Wird allerdings die BSA-Konzentration berücksichtigt, so ergeben sich die 3-Nitrotyrosinmengen zu 28,8  $\mu\text{M}$  bzw. 36,5  $\mu\text{M}$ . Diese Werte liegen eng beieinander und zeigen, daß die Umsetzung äquivalenter Mengen BSA mit gleichen Mengen HOONO etwa gleiche Mengen 3-Nitrotyrosin ergibt.

Werden die Konzentrationen von 3-Nitrotyrosin gegen die Konzentration an zugegebenem HOONO aufgetragen, so stellt man fest, daß sich unter Berücksichtigung des Nullpunktes keine Geraden ergeben. Die Nitrierung verläuft also nicht linear (die doppelte Menge HOONO führt nicht zur doppelten Menge 3-Nitrotyrosin). Ähnliche Beobachtungen machen auch Bible et al. (Bible et al., 1999), die bei der Nitrierung unterschiedlicher Proteine mit Salpetriger Säure feststellen, daß die Produktbildung nicht mit dem unterschiedlichen Tyrosingehalt der Proteine korreliert. Es scheint also so zu sein, daß die Tertiärstruktur der Proteine einen erheblichen Einfluß auf die Nitrierung hat. Dies wird durch die Ergebnisse von Jiao et al. (Jiao et al., 2001) bestätigt, die bei Untersuchungen zur Nitrierung von Humanem Serumalbumin (HSA) mit Hilfe einer HPLC/MS-Kopplung feststellen, daß bestimmte Tyrosinreste bevorzugt reagieren.

#### 4.3.2.2 Bestimmung mittels HPLC

Kleinere Mengen 3-Nitrotyrosin lassen sich gut mittels HPLC bestimmen (Cymes und Wolfenstein-Todel, 1996; Hensley et al., 1997; Kovina et al., 1996), allerdings muß hier der Probenvorbereitung besonderes Augenmerk geschenkt werden, da die notwendige Hydrolyse der Proteine zu den freien Aminosäuren, die entweder sauer oder auch enzymatisch erfolgt, vollständig erfolgen muß. Und obwohl 3-Nitrotyrosin allgemein als hydrolysestabil gilt (Giese und Riordan, 1975), wurde in einigen Untersuchungen eine signifikante Umwandlung von 3-Nitrotyrosin in Aminotyrosin beobachtet (Shigenaga et al., 1997).

Unterschiede der einzelnen Methoden betreffen hauptsächlich die Art des verwendeten Detektors. Mit Hilfe der UV/VIS-Detektion, auch in Form eines Dioden-Array-Detektors, konnte 3-Nitrotyrosin in biologischen Proben noch in einer Konzentration von 0,2  $\mu\text{M}$  nachgewiesen werden (Kaur und Halliwell, 1994). Durch Vorsäulen-Derivatisierung der Aminosäuren mit PITC (Heinrikson und Meredith, 1984), DABITC (Salva und Aviles, 1989), DANS-Cl (Bayer et al., 1976) oder DABS-Cl (Chang und Knecht, 1991; Chang et al., 1982; Chikuma et al., 1991; de Witte et al., 1995; Knecht und Chang, 1986; Lin und Chang, 1975; Malencik et al., 1990; Stocchi et al., 1989; Tsuda et al., 1999) gelingt die Detektion von Aminosäuren im unteren pmol-Bereich. Die Bestimmung mit Fluoreszenz-Detektoren nach Reduktion von 3-Nitrotyrosin zu 3-Aminotyrosin bzw. der Reaktion der Aminosäure mit einem Fluoreszenz-Marker senkt das Detektionslimit auf 0,1 pmol. Ebenfalls im unteren pmol-Bereich, allerdings mit höherer Selektivität, liegt das Detektionslimit der Elektrochemischen Detektion (Detektionslimit 20 fmol; Hensley et al., 1997); die Verwendung von GC/MS ermöglicht schließlich eine Detektion im Attomol-Bereich (Crowley et al., 1998).

Für unsere Ziele scheint die HPLC mit UV/VIS-Detektion die Methode der Wahl zu sein, zumal die erreichbaren Ergebnisse im Verhältnis zum apparativen und finanziellen Aufwand einen guten Kompromiß darstellen. Gerade hinsichtlich der Probenvorbereitung erweisen sich die gut definierten Systeme unserer Experimente als vorteilhaft, darüberhinaus ist auch die Untersuchung biologischer Proben möglich (Fukuyama et al., 1997; Kaur und Halliwell, 1994). Wie sich gezeigt hat, können an die mit Polyacrylsäure gepfropfte PDLLA-Folie ausreichend große Proteinmengen gebunden werden, so daß hier eine Untersuchung auf 3-Nitrotyrosin erfolgversprechend ist. Die kovalent an TiAl6V4 gebundenen Proteinmengen liegen dagegen in einem Bereich, der ein Ausweichen auf andere Nachweismethoden erforderlich macht.

#### 4.3.2.3 Bestimmung mittels ELISA

Kleinste Mengen 3-Nitrotyrosin lassen sich durch immunologische Methoden nachweisen. Die hierbei verwendeten Antikörpern werden entweder als polyklonale oder als monoklonale Antikörper aus Kaninchen gewonnen, die zuvor mit durch HOONO modifiziertem KLH (keyhole limpet hemocyanin) oder BSA behandelt wurden (Beckman, 1994; Khan et al., 1998). Die Bestimmung von 3-Nitrotyrosin mittels ELISA liefert in erster Linie

semiquantitative Ergebnisse, eignet sich somit gut für den Vergleich unterschiedlicher Proben. Durch Kopplung mit quantitativen Bestimmungsmethoden, beispielsweise HPLC, wird allerdings ebenfalls eine Quantifizierung der Ergebnisse möglich.

Die Entwicklung eines gut funktionierenden ELISA kann zeitraubend sein, da vielerlei Parameter aufeinander abgestimmt werden müssen. Im Mittelpunkt stehen die Protein/Protein-Interaktionen sowie die Protein/Substrat-Interaktionen, die von verschiedenen Faktoren abhängen. Neben der spezifischen Interaktion spielt besonders die unspezifische Adsorption eine Rolle, die durch Variation der Antikörperkonzentration, ein zusätzliches Protein im Überschuß oder den Einfluß des pH-Wertes minimiert werden soll.

Allgemeine Vorschriften empfehlen eine Antigenbindung (coating) im Alkalischen (etwa pH 9,4), maximale Adsorption erfolgt allerdings bei  $\text{pH} = \text{pI}$  (Sharpe et al., 1997). Auch die Antigenkonzentration hat einen Einfluß, allerdings wird hier das Plateau maximaler Belegung schon bei 5-20  $\mu\text{g/ml}$  erreicht. Die Adsorption beginnt unmittelbar nach Kontakt mit dem Substrat, nach 5 Minuten sind etwa 80% der maximal adsorbierten Proteinmenge gebunden, nach 30 Minuten bleibt der Wert konstant (Camps, 1999).

Immunologische Methoden wurden und werden erfolgreich zur Bestimmung von 3-Nitrotyrosin herangezogen. Beckman et al. (Beckman, 1994) beispielsweise untersuchten Gewebeproben von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen mittels Immunohistochemie. Über bildgebende Medien (CCD) kann so durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper mittels Intensitätsmessung eine quantitative Bestimmung erfolgen (Haddad et al., 1994). Neben dem Immunohistochemischen Nachweis werden die Antikörper auch für ELISA verwendet (Ye et al., 1996), eine Übersicht findet sich bei Onorato et al. (Onorato et al., 1998). Ein kompetitiver ELISA mit polyklonalen Antikörpern wurde durch Khan et al. (Khan et al., 1998) entwickelt. Um eine Quantifizierung zu ermöglichen, wurde der Gehalt an 3-Nitrotyrosin in mit HOONO nitriertem BSA photometrisch bestimmt. Nach der Beschichtung der 96Well-Platten mit diesem BSA wird durch serielle Verdünnung des nitrierten Proteins eine Standardkurve der kompetitiven Inhibierung der Antikörperbindung bei gleichzeitiger Inkubation ermittelt. Durch diesen Test läßt sich sowohl proteingebundenes als auch freies 3-Nitrotyrosin nachweisen, wobei die Mindestkonzentration von freiem 3-Nitrotyrosin mit 10  $\mu\text{M}$  relativ hoch liegt; die Antikörper weisen also nur eine geringe Affinität gegenüber freiem 3-Nitrotyrosin auf. Weiter sind die Antikörper in der Lage, zwischen unterschiedlichen Umgebungen zu unterscheiden. Da die Kalibration mit nitriertem BSA erfolgt, liefert der Test für andere Proteine nur semiquantitative Ergebnisse.



Einen anderen Weg beschreiten ter Steege et al. (ter Steege et al., 1998), die einen Sandwich-ELISA mit monoklonalen Antikörpern entwickelten. Auch hier geschieht die Kalibration über nitrierte Proteine, deren 3-Nitrotyrosingehalt photometrisch bestimmt wurde. Dieser Sandwich-ELISA bietet zwar eine hohe Empfindlichkeit sowie eine große Spezifität, benötigt allerdings relativ große Mengen des monoklonalen Antikörpers.

#### 4.3.3 Konsequenzen der Nitrierung: Signalwege, Proteasom und Redoxstatus

Neben der Funktion als Marker für RNS gewinnt die Untersuchung des Einflusses von 3-Nitrotyrosin in Proteinen und Peptiden zunehmend an Bedeutung, da sich die Proteinnitrierung auf verschiedene Prozesse der Zelle auswirkt. Sie beeinflusst beispielsweise die Phosphorylierung von Tyrosin und wirkt somit auf Zell-Proliferation und Zelldifferenzierung, die Regulation von Enzymaktivitäten und Apoptose (Moulian et al., 2001).

Die Nitrierung von Tyrosyl-Resten kann zu einer Inaktivierung physiologisch aktiver Peptide führen (Ducrocq et al., 1998), oder aber zum Verlust der katalytischen Aktivität eines Enzyms (Souza et al., 2000). Cymes et al. (Cymes und Wolfenstein-Todel, 1996) konnten zeigen, daß schon die Modifizierung eines einzelnen Tyrosylrestes genügt, um die Bindungsfähigkeit eines Peptidhormons an seinen Rezeptor signifikant zu verringern. Außer in proteingebundener Form scheint auch freies 3-Nitrotyrosin negative Auswirkungen aufzuweisen, da es durch seine neurotoxischen Eigenschaften eine Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen spielen könnte (Mihm et al., 2001).

Der biologischer Schutz gegen Peroxosalpetrige Säure beinhaltet neben der Bildungskontrolle auch die Umsetzung von HOONO mit Substanzen, die zu nichttoxischen Produkten führen (Arteel et al., 1999). Zudem scheint es vereinzelt Reparaturmechanismen für nitrierte Proteine durch 'Protein Nitratasen' zu geben (Kuo et al., 1999).

Besondere Aufmerksamkeit wird seit Kurzem auch dem Abbau nitrierter bzw. oxidierter Proteine gewidmet. Zu den proteolytischen Systemen gehören das Lysosom,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteasen sowie das Proteasom, das für den Abbau der cytosolischen sowie einiger Membranproteine wichtig zu sein scheint. Das Proteasom wurde bisher im Cytosol sowie im Nucleus gefunden und spielt eine wichtige Rolle beim Abbau der durch ROS/RNS modifizierten Proteine (Grune et al., 1997). In diesem Zusammenhang wird auch der Protein-Turnover im Zuge der Alterung untersucht: die hier zu beobachtende Akkumulation oxidierter Proteine

könnte damit zusammenhängen, daß entweder mehr Proteine oxidiert werden, oder aber, daß der Protein Turnover sinkt.

Die Präsentation hydrophober Domänen an der Oberfläche modifizierter Proteine scheint eine Signalwirkung für das Proteasom zu besitzen (Hydrophobizität) (Pacifci et al., 1993). Dies könnte deshalb von besonderer Bedeutung sein, da aggregierte Proteine schlecht proteolytisch verdaut werden können. So werden mit HOONO behandelte Proteine (Konformation) durch das 20S-Proteasom (benötigt keine Kofaktoren) etwa doppelt so schnell abgebaut wie die entsprechenden unbehandelten Proteine (Merker und Grune, 2000). Der 26S-Proteasom-Komplex (Coux et al., 1996) enthält regulatorische Untereinheiten, die Ubiquitin binden können (ATP abhängig). Neben anderen Regulationsmechanismen (DeMartino und Slaughter, 1999) spielt in diesem Zusammenhang besonders die Aktivierung des Ubiquitin-Systems nach oxidativem Stress eine Rolle (Shang et al., 1997). Die Regulierung der Ubiquitin-Konjugierenden Enzyme (Ubiquitin aktivierendes Enzym E1, Ubiquitin konjugierendes Enzym E2) erfolgt über den Redox-Status der Zelle, beispielsweise durch das GSSG:GSH-Verhältnis (Obin et al., 1998). Neben der Erkennung hydrophober Domänen spielt also gerade auch die Erkennung ubiquitinierter Proteine eine wichtige Rolle für den Turnover oxidativ modifizierter Proteine.

## 4.4 Ausblick

In den vorausgegangenen Experimenten konnte, nach Auswahl geeigneter Methoden zur kovalenten Anbindung, die Größenordnung der pro Flächeneinheit an die interessierenden Substrate anzubindenden Proteinmengen bestimmt werden. Für die Titanlegierung sollen nun geeignete Spacer gefunden werden, die eine gezielte Abspaltung der Proteine vom Substrat ermöglichen. Dabei sollen auch mögliche Spaltstellen innerhalb der Proteine berücksichtigt werden. Die so abgelösten Proteine können dann nach der vollständigen Etablierung des in Entwicklung befindlichen ELISA auf ihren Gehalt an 3-Nitrotyrosin untersucht werden.

Die guten Ergebnisse zur Proteinanbindung an die PDLLA-AAc-Folien erlauben den Übergang von Modellproteinen zu den klinikrelevanten Proteinspezies, die nun nach kovalenter Bindung mittels HOONO modifiziert werden können. Nach Hydrolyse der Folienabschnitte kann anschließend mittels HPLC der Gehalt an 3-Nitrotyrosin bestimmt werden. Gleichzeitig soll über eine Modifizierung der Pfropfung nachgedacht werden, die zu einer Hydrogelschicht mit erheblich weniger Carboxylgruppen führen könnte.

Neben der Untersuchung *in vitro* erlauben die gezeigten Systeme auch Untersuchungen in Zellkulturen. Experimente *in vivo* sind ebenfalls denkbar, bedürfen im Vorfeld aber noch der Klärung prinzipieller Fragestellungen. Auch wenn der Gegenstand unserer Untersuchungen eine einfache, übertragbare Methode zur Verfolgung und Beurteilung entzündlicher Veränderungen an gebundenen Proteinen ist, werden auf längere Sicht, gerade auch hinsichtlich der Untersuchungen *in vivo*, die physiologischen Aktivitäten der unterschiedlichen Proteine parallel zu bestimmen sein.

## 5 Zusammenfassung

Moderne Biomaterialien erfüllen heute weitgehend die an sie gestellten Anforderungen. Trotzdem kann es beim Kontakt mit den unterschiedlichen Körpergeweben zu entzündlichen Reaktionen kommen, die zur Bildung reaktiver Molekülspezies führen. Das Ausmaß dieser Reaktionen hängt entscheidend von den Oberflächeneigenschaften des Biomaterials ab und kann durch die kovalente Anbindung physiologisch aktiver Proteine und Peptide positiv beeinflusst werden. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl die Anbindung verschiedener Proteine und Peptide an unterschiedliche Festkörperoberflächen sowie die Modifizierung ausgesuchter Modell-Proteine durch den Einfluß der bei entzündlichen Reaktionen gebildeten Molekülspezies untersucht.

Zur Anbindung von Meerrettichperoxidase an TiAl6V4 und Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> wurden die jeweiligen Festkörperoberflächen mit Aminopropyltriethoxysilan funktionalisiert. Die Zahl der auf den Oberflächen eingeführten Aminogruppen erweist sich als von der Verweilzeit der Festkörper in der abkühlenden Reaktionslösung abhängig. Bei einer Verweilzeit von 10 Minuten können auf einer Fläche von 10 nm<sup>2</sup> auf TiAl6V4 etwa 23 Aminogruppen, auf Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> etwa 60 Aminogruppen eingeführt werden. Nach Reaktion dieser Gruppen mit Glutaraldehyd stehen auf einer Fläche von 10 nm<sup>2</sup> schließlich 16 aktivierte Aminogruppen auf TiAl6V4 bzw. 30 aktivierte Aminogruppen auf Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> für die kovalente Anbindung von Proteinen zur Verfügung – ca. 70 bzw. 50% der insgesamt auf der Oberfläche eingeführten Aminogruppen.

An die aktivierten Aminofunktionen lassen sich auf einer Fläche von 1 µm<sup>2</sup> auf TiAl6V4 sowie auf Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> etwa 70 Moleküle Meerrettichperoxidase kovalent binden.

Versuche zur Aminofunktionalisierung mit längerer Verweilzeit der Festkörper in der abkühlenden Reaktionslösung führen zu einer größeren Anzahl Aminogruppen; es zeigt sich allerdings, daß dies letztlich nicht zu einer Erhöhung der Zahl kovalent gebundener Proteinmoleküle führt.

Die Anbindung von Proteinen und Peptiden an die mit Polyacrylsäure funktionalisierte PDLA-Folie erfolgt nach Aktivierung der Carboxylgruppen mit N-Hydroxysuccinimid. Es lassen sich relativ große Mengen Protein kovalent binden (20-30 µg/cm<sup>2</sup>), wobei die Menge von der Qualität der Polyacrylsäure-Pfropfung sowie der Natur der Proteine bzw. Peptide abhängt: auf einer Fläche von 10 nm<sup>2</sup> können etwa 390 Moleküle RGDSPASSKP-Peptid,

1820 Moleküle SIKVAV-Peptid, 10-30 Moleküle Meerrettichperoxidase, 4-6 Moleküle Rinderserumalbumin oder 0,5-1 Moleküle Fibronektin kovalent gebunden werden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Molekulare Masse und somit die Größe der Moleküle mit der Bindungsdichte korreliert.

Die Versuche zur einzeln, parallel oder nacheinander erfolgenden Anbindung des Dipeptides VK sowie von Rinderserumalbumin ergeben, daß durch die einzeln sowie parallel erfolgende Anbindung etwa jeweils gleich große Mengen Protein bzw. Peptid gebunden werden: auf einer Fläche von 10 nm<sup>2</sup> können zwischen 230 - 290 Moleküle VK-Peptid und 3 - 4 Moleküle Rinderserumalbumin gebunden werden. Ähnliche Ergebnisse ergeben sich bei nacheinander erfolgender Anbindung von zuerst VK-Peptid und anschließend Rinderserumalbumin: es werden etwa 230 Moleküle VK-Peptid und 4 Moleküle Rinderserumalbumin gebunden. Wird allerdings zuerst Rinderserumalbumin gebunden und daran anschließend VK-Peptid, so werden zwar noch immer 3-4 Moleküle Rinderserumalbumin gebunden, allerdings nur noch etwa 20 Moleküle VK-Peptid. Diese Abnahme um mehr als 90% läßt sich so erklären, daß die Rinderserumalbumin-Moleküle in diesem Fall eine dichte Proteinschicht bilden, die eine Anbindung des VK-Peptides behindert. Weitere Überlegungen zur räumlichen Gestalt der Pfropf-Copolymerschicht ergeben, daß von der Meerrettichperoxidase beispielsweise ca. 50 Moleküle übereinander gebunden werden – dies könnte ein Grund dafür sein, daß die Aktivität der gebundenen Meerrettichperoxidase um etwa Faktor 1000 geringer ist als die des frei in Lösung befindlichen Enzyms.

Im Mittelpunkt der insbesondere bei Entzündungsreaktionen im Gewebe gebildeten Reaktiven Sauerstoff Spezies stehen das Hydroxylradikal, die Hypochlorige Säure sowie die Peroxosalpetrige Säure. In Proteinen bewirken diese Reagenzien neben oxidativen Veränderungen außerdem die Hydroxylierung, Chlorierung und Nitrierung aromatischer Aminosäure-Reste. Die chlorierende Wirkung der Hypochlorigen Säure sowie die nitrierende Wirkung der im Labor selbst hergestellten Peroxosalpetrigen Säure wurde anhand einfacher Chlorierungs- bzw. Nitrierungsversuche an aromatischen Systemen mittels RP-Chromatographie überprüft. Das oxidierende Potential der Peroxosalpetrigen Säure sowie der durch ein Fenton-System erzeugten Hydroxyl-Radikale wurde über die Bestimmung der Zunahme von Oxogruppen in modifiziertem Rinderserumalbumin ermittelt. Es zeigt sich, daß etwa 1,5% der nicht modifizierten Rinderserumalbumin-Moleküle statistisch eine Oxo-Gruppe tragen. Nach Reaktion mit dem von uns verwendeten Fenton-System unter Zugabe

von 2,5 mM bzw. 25 mM Wasserstoffperoxid ergibt sich eine Erhöhung dieses Wertes auf etwa 17 % bzw. 25%. Eine Erhöhung auf ebenfalls 17% kann auch nach der Reaktion mit 5 mM Peroxosalpetriger Säure beobachtet werden - Peroxosalpetrige Säure weist also ein beträchtliches Oxidationspotential auf. Der direkte Nachweis der Hydroxylradikale im Fenton-System erfolgt, nach Abfangen mittels Spin-Falle, durch Elektronenspinresonanz-Spektroskopie. Die Untersuchungen erlauben eine Quantifizierung: bei einer Zugabe von 0,25 mM Wasserstoffperoxid werden je ml etwa 16 nmol OH-Radikale gebildet. Über die zugehörige Erhöhung der Zahl der Oxogruppen auf 5% läßt sich schließen, daß etwa jedes 8. OH-Radikal zur Bildung einer Oxogruppe führt.

Für die Untersuchung der Reaktionen der Proteine mit reaktiven Molekülspezies wird ein spezifischer Marker ausgewählt. Unter Konzentration auf 3-Nitrotyrosin wurde mit Hilfe der Hochauflösenden Flüssigkeitschromatographie (HPLC) eine empfindliche Nachweismethode für diesen Marker etabliert. Zur Methodenentwicklung gehört die Zuordnung der Signale zu den wichtigsten proteinogenen Aminosäuren sowie den Derivaten 3-Chlorotyrosin und 3-Nitrotyrosin. Untersucht wurde insbesondere mit Peroxosalpetriger Säure (HOONO) modifiziertes Rinderserumalbumin: die direkte photometrische Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in Abhängigkeit der zugegebenen Menge HOONO zeigt, daß mit zunehmender Konzentration HOONO eine kleiner werdende Anzahl Tyrosyl-Reste zusätzlich modifiziert wird - die Nitrierung verläuft nicht linear. In nicht mit Peroxosalpetriger Säure behandeltem Rinderserumalbumin kann kein 3-Nitrotyrosin nachgewiesen werden. Zur Untersuchung mittels HPLC werden die Proteinproben hydrolysiert und mit Dimethylaminoazobenzolsulfonylchlorid derivatisiert. Die Quantifizierung erfolgt nach Kalibration mit 3-Nitrotyrosin: in Gegenwart von Rinderserumalbumin, Meerrettichperoxidase oder  $\beta$ -Lactoglobulin zeigt sich eine Abhängigkeit von der jeweils verwendeten Matrix. Die Ergebnisse zur Untersuchung einer Probe, die sowohl direkt photometrisch als auch mittels HPLC ermittelt wurden, zeigen eine sehr gute Übereinstimmung. Um noch kleinere Mengen 3-Nitrotyrosin bestimmen zu können, wird ein indirekter ELISA mit polyklonalen Antikörpern entwickelt. Die Entwicklung ist noch nicht abgeschlossen, die ersten Ergebnisse stimmen allerdings zuversichtlich: muß für die Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in Rinderserumalbumin mittels HPLC dieses mit noch mindestens 600  $\mu$ M HOONO umgesetzt werden, so genügt für den ELISA schon jetzt eine Konzentration von nur 2,5  $\mu$ M HOONO.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alvarez, B., Denicola, A. und Radi, R. (1995). Reaction between peroxynitrite and hydrogen peroxide: formation of oxygen and slowing of peroxynitrite decomposition. *Chem Res Toxicol* **8**, 859-64.
- Arteel, G. E., Briviba, K. und Sies, H. (1999). Protection against peroxynitrite. *FEBS Lett* **445**, 226-30.
- Babior, B. M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**, 1464-76.
- Balzli, B. (2000). "Sprengwirkung einer Axt". *Der Spiegel* **26**.
- Bayer, E., Grom, E., Kaltenege, B. und Uhmann, R. (1976). Separation of amino acids by high performance liquid chromatography. *Anal Chem* **48**, 1106-9.
- Beckman, J. S. (1996). Physiological and Pathological Chemistry of Nitric Oxide. In "Nitric Oxide. Principles and Actions." (J. J. Lancaster, ed.), pp. 46-53. Academic Press, San Diego.
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A. und Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1620-4.
- Beckman, J. S., Ischiropoulos, H., Zhu, L., van der Woerd, M., Smith, C., Chen, J., Harrison, J., Martin, J. C. und Tsai, M. (1992). Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* **298**, 438-45.
- Beckman, J. S. et al. (1994). Oxygen Radicals in Biological Systems. In "Methods in Enzymology" (L. Packer, ed.), vol. 233, pp. 229. Academic Press, San Diego.
- Berlett, B. S. and Stadtman, E. R. (1997). Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 20313-20316.

- Bible, K. C., Boerner, S. A. und Kaufmann, S. H. (1999). A one-step method for protein estimation in biological samples: nitration of tyrosine in nitric acid. *Analytical Biochemistry* **267**, 217-221.
- Bohle, D. S., Hansert, B., Paulson, S. C. und Smith, B. D. (1994). Biomimetic synthesis of the putative cytotoxin peroxynitrite, ONOO-, and its characteristics as a tetramethylammonium salt. *Journal of the American Chemical Society* **116**, 7423-7424.
- Bos, E. S., van der Doelen, A. A., van Rooy, N. und Schuurs, A. H. (1981). 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine as an Ames test negative chromogen for horse-radish peroxidase in enzyme-immunoassay. *J Immunoassay* **2**, 187-204.
- Boveris, A. und Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **134**, 707-716.
- Browne, M. und Gregson, P. J. (1994). Surface modification of titanium alloy implants. *Biomaterials* **15**, 894-8.
- Buse, G., Soulimane, T., Dewor, M., Meyer, H. E. und Bluggel, M. (1999). Evidence for a copper-coordinated histidine-tyrosine cross-link in the active site of cytochrome oxidase. *Protein Sci* **8**, 985-90.
- Buss, H., Chan, T. P., Sluis, K. B., Domigan, N. M. und Winterbourn, C. C. (1997). Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic Biol Med* **23**, 361-6.
- Cadenas, E. (1995). Mechanisms of Oxygen Activation and Reactive Oxygen Species Detoxification. In "Oxidative Stress und Antioxidant Defenses in Biology" (S. Ahmad, ed.), pp. 1-46. Chapman&Hall, New York.
- Camps, M. B. (1999). Quantitative Beschreibung von Proteinadsorptionsprozessen an Polymeroberflächen mittels ELISA. Dissertation, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, Aachen.
- Cao, G. und Cutler, R. G. (1995). Protein oxidation and aging. I. Difficulties in measuring reactive protein carbonyls in tissues using 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Arch Biochem Biophys* **320**, 106-14.



- Cattaneo, M. V. und Luong, J. H. (1994). A stable water-soluble tetramethylbenzidine-2-hydroxypropyl-beta- cyclodextrin inclusion complex and its applications in enzyme assays. *Anal Biochem* **223**, 313-20.
- Chang, J. Y. und Knecht, R. (1991). Direct analysis of the disulfide content of proteins: methods for monitoring the stability and refolding process of cystine-containing proteins. *Anal Biochem* **197**, 52-8.
- Chang, J. Y., Knecht, R. und Braun, D. G. (1982). A complete separation of dimethylaminoazobenzenesulphonyl-amino acids. Amino acid analysis with low nanogram amounts of polypeptide with dimethylaminoazobenzenesulphonyl chloride. *Biochem J* **203**, 803-6.
- Chikuma, T., Hanaoka, K., Loh, Y. P., Kato, T. und Ishii, Y. (1991). A colorimetric assay for measuring peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **198**, 263-7.
- Constantin-Teodosiu, D., Greenhaff, P. L., Gardiner, S. M., Randall, M. D., March, J. E. und Bennett, T. (1995). Attenuation by creatine of myocardial metabolic stress in Brattleboro rats caused by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* **116**, 3288-92.
- Cook, A. D., Pajvani, U. B., Hrkach, J. S., Cannizzaro, S. M. und Langer, R. (1997). Colorimetric analysis of surface reactive amino groups on poly(lactic acid-co-lysine):poly(lactic acid) blends. *Biomaterials* **18**, 1417-24.
- Coux, O., Tanaka, K. und Goldberg, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* **65**, 801-47.
- Crow, J. P. und Ischiropoulos, H. (1996). Detection and Quantitation of Nitrotyrosine Redidues in Proteins: In Vivo Marker of Peroxynitrite. In "Methods in Enzymology", vol. 269, pp. 185-194. Academic Press.
- Crowley, J. R., Yarasheski, K., Leeuwenburgh, C., Turk, J. und Heinecke, J. W. (1998). Isotope dilution mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine in proteins and tissues is facilitated by reduction to 3-aminotyrosine. *Anal Biochem* **259**, 127-35.

- Cymes, G. D. und Wolfenstein-Todel, C. (1996). Identification of a tyrosine residue in ovine placental lactogen as essential for its binding to receptors. *Biochim Biophys Acta* **1294**, 31-6.
- Darnell, J., Lodish, H. und Baltimore, D. (1994). "Molekulare Zellbiologie". Walter de Gruyter, Berlin.
- de Witte, P. A., Cuveele, J. F., Merlevede, W. J. und Vandenheede, J. R. (1995). Analysis of phosphorylhydroxyamino acids present in hydrolyzed cell extracts using dabsyl derivatization. *Anal Biochem* **226**, 1-9.
- Dean, R. T., Shanlin, F. U., Stocker, R. und Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem.J.* **324**, 1-18.
- DeMartino, G. N. und Slaughter, C. A. (1999). The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J Biol Chem* **274**, 22123-6.
- Drumright, R. E., Gruber, P. R. und Henton, D. E. (2000). Polylactic Acid Technology. *Advanced Materials* **12**, 1841-1846.
- Ducrocq, C., Dendane, M., Laprevote, O., Serani, L., Das, B. C., Bouchemal-Chibani, N., Doan, B. T., Gillet, B., Karim, A., Carayon, A. und Payen, D. (1998). Chemical modifications of the vasoconstrictor peptide angiotensin II by nitrogen oxides (NO, HNO<sub>2</sub>, HOONO)--evaluation by mass spectrometry. *Eur J Biochem* **253**, 146-53.
- Eiserich, J. P., Cross, C. E., Jones, A. D., Halliwell, B. und van der Vliet, A. (1996). Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J Biol Chem* **271**, 19199-208.
- Eiserich, J. P., Hristova, M., Cross, C. E., Jones, A. D., Freeman, B. A., Halliwell, B. und van der Vliet, A. (1998). Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* **391**, 393-7.
- Fenton, H. J. H. (1894). Oxidation of Tartaric Acid in presence of Iron. *Journal of the chemikal society* **65**, 899.

- Finkel, T. und Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239-47.
- Fukuyama, N., Takebayashi, Y., Hida, M., Ishida, H., Ichimori, K. und Nakazawa, H. (1997). Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock. *Free Radic Biol Med* **22**, 771-4.
- Garner, R. C. (1975). Testing of some benzidine analogues for microsomal activation to bacterial mutagens. *Cancer Lett* **1**, 39-42.
- Gaur, R. K. und Gupta, K. C. (1989). A spectrophotometric method for the estimation of amino groups on polymer supports [published erratum appears in *Anal Biochem* 1989 Nov 15;183(1):197]. *Anal Biochem* **180**, 253-8.
- Giese, R. W. und Riordan, J. F. (1975). Nitrotyrosine internal standard for amino acid analysis. *Anal Biochem* **64**, 588-92.
- Gomez-Vega, J. M., Saiz, E., Tomisa, A. P., Ohn, T., Suganuma, K., Marshall, G. W. und Marshall, S. J. (2000). Novel Bioactive Functionally Graded Coatings on Ti6Al4V. *Advanced Materials* **12**, 894-898.
- Göpferich, A. (1996). Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* **17**, 103-114.
- Griffith, O. W. und Stuehr, D. J. (1995). Nitric Oxide Synthases: Properties and Catalytic Mechanism. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 707-736.
- Grune, T., Reinheckel, T. und Davies, K. J. (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *Faseb J* **11**, 526-34.
- Habeeb, A. F. S. A. (1965). Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Analytical biochemistry* **14**, 328-336.
- Haddad, I. Y., Pataki, G., Hu, P., Galliani, C., Beckman, J. S. und Matalon, S. (1994). Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest* **94**, 2407-13.

- Halliwell, B. (1997). What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Lett* **411**, 157-60.
- Halliwell, B. und Gutteridge, J. M. C. (1999). "Free Radicals in Biology and Medicine". Oxford University Press, New York.
- Hanisch, C. (2000). Künstliche Organe: Organ-Designer. *Bild der Wissenschaft* **11**, 22-29.
- Heinrikson, R. L. und Meredith, S. C. (1984). Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal Biochem* **136**, 65-74.
- Hensley, K., Maidt, M. L., Pye, Q. N., Stewart, C. A., Wack, M., Tabatabaie, T. und Floyd, R. A. (1997). Quantitation of protein-bound 3-nitrotyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine by high-performance liquid chromatography with electrochemical array detection. *Anal Biochem* **251**, 187-95.
- Hensley, K., Williamson, K. S. und Floyd, R. A. (2000). Measurement of 3-nitrotyrosine and 5-nitro-gamma-tocopherol by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Free Radic Biol Med* **28**, 520-8.
- Herbert, C. B., Nagaswami, C., Bittner, G. D., Hubbell, J. A. und Weisel, J. W. (1998). Effects of fibrin micromorphology on neurite growth from dorsal root ganglia cultured in three-dimensional fibrin gels. *J Biomed Mater Res* **40**, 551-9.
- Herce-Pagliai, C., Kotecha, S. und Shuker, D. E. (1998). Analytical methods for 3-nitrotyrosine as a marker of exposure to reactive nitrogen species: a review. *Nitric Oxide* **2**, 324-36.
- Hern, D. L. und Hubbell, J. A. (1998). Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing. *J Biomed Mater Res* **39**, 266-76.
- Hille, G. H. (1966). Titanium for surgical implants. *Journal of materials* **1**, 373-383.
- Hogg, N., Darley-Usmar, V. M., Wilson, M. T. und Moncada, S. (1992). Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J* **281**, 419-24.

- Horton, H. R. und Swaisgood, H. E. (1987). Covalent Immobilization of Proteins by Techniques Which Permit Subsequent Release. In "Immobilized Enzymes and Cells. Part B" (K. Mosbach, ed.), vol. 135. Academic Press, San Diego.
- Hubbell, J. A. (1999). Biotechnology. A new-for-old urinary bladder [news]. *Nature* **398**, 198-9.
- Hughes, M. N. und Nicklin, H. G. (1970). *J.Am.Chem.Soc.* **96**, 1248.
- Hull, D. (1995). Materials selection. *Medical device technology* **6**, 14-21.
- Ignarro, L. J., Cirino, G., Casini, A. und Napoli, C. (1999). Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* **34**, 879-86.
- Ischiropoulos, H. (1998). Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* **356**, 1-11.
- Ischiropoulos, H. und al-Mehdi, A. B. (1995). Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett* **364**, 279-82.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J. C., Smith, C. D. und Beckman, J. S. (1992). Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* **298**, 431-7.
- Jiao, K., Mandapati, S., Skipper, P. L., Tannenbaum, S. R. und Wishnok, J. S. (2001). Site-selective nitration of tyrosine in human serum albumin by peroxynitrite. *Anal Biochem* **293**, 43-52.
- Joseph, P. D., Eling, T. und Mason, R. P. (1982). The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'- tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates. *J Biol Chem* **257**, 3669-75.
- Junqueira, L. C. und Carneiro, J. (1996). "Histologie". Springer Verlag, Berlin.
- Kantlehner, M., Schaffner, P., Finsinger, D., Meyer, J., Jonczyk, A., Diefenbach, B., Nies, B., Hölzemann, G., Goodman, S. L. und Kessler, H. (2000). Surface Coating with cyclic rgd peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation. *Chembiochem* **1**, 107-114.

- Kaur, H. und Halliwell, B. (1994). Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett* **350**, 9-12.
- Kaur, H., Lyras, L., Jenner, P. und Halliwell, B. (1998). Artefacts in HPLC detection of 3-nitrotyrosine in human brain tissue. *J Neurochem* **70**, 2220-3.
- Keller, J. C., Stanford, C. M., Wightman, J. P., Draughn, R. A. und Zaharias, R. (1994). Characterizations of titanium implant surfaces. III. *J Biomed Mater Res* **28**, 939-46.
- Kenley, R. A., Lee, M. O., Mahoney, T. R. und Sanders, L. M. (1987). Poly-(lactide-co-glycolide) decomposition kinetics in vivo and in vitro. *Macromolecules* **20**, 2398-2403.
- Khan, J., Brennand, D. M., Bradley, N., Gao, B., Bruckdorfer, R., Jacobs, M. und Brennan, D. M. (1998). 3-Nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method [published erratum appears in *Biochem J* 1998 Jun 15;332 (Pt 3):808]. *Biochem J* **330**, 795-801.
- Kikuchi, Y. und Noda, A. (1976). Polyelectrolyte complexes of heparin with chitosan. *Journal of applied polymer science* **20**, 2561-2563.
- Kiranas, E. R., TzouwaraKarayanni, S. M. und Karayannis, M. I. (1997). The reaction of glutamic acid and trinitrobenzenesulfonic acid - kinetic study and analytical application. *Talanta* **44**, 1113-1121.
- Kissel, T., Brich, Z., Bantle, S., Lancranja, I. und Nimmerfall, V. P. (1991). Parenteral depot-systems on the basis of biodegradable polyesters. *Journal of controlled release* , 27.
- Knecht, R. und Chang, J. Y. (1986). Liquid chromatographic determination of amino acids after gas-phase hydrolysis and derivatization with (dimethylamino)azobenzenesulfonyl chloride. *Anal Chem* **58**, 2375-9.
- Komsa-Penkova, R. S., Rashap, R. K. und Yomtova, V. M. (1997). Advantages of orange-labelled collagen and gelatine as substrates for rapid collagenase activity measurement. *Journal of biochemical and biophysical methods* **34**, 237-249.

- Koppenol, W. H. (1998). The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* **25**, 385-91.
- Koppenol, W. H., Kissner, R. und Beckman, J. S. (1996). Syntheses of Peroxynitrite: To Go with the Flow or on Solid Grounds? In "Methods in Enzymology" , vol. 269. Academic Press, San Diego.
- Kovina, M., Viryasov, M., Baratova, L. und Kochetov, G. (1996). Localization of reactive tyrosine residues of baker's yeast transketolase. *FEBS Lett* **392**, 293-4.
- Kuo, W. N., Kanadia, R. N., Shanbhag, V. P. und Toro, R. (1999). Denitration of peroxynitrite-treated proteins by 'protein nitrates' from rat brain and heart. *Mol Cell Biochem* **201**, 11-6.
- Lacy, F., Gough, D. A. und Schmid-Schönbein, G. W. (1998). Role of the xanthine oxidase in hydrogen peroxide production. *Free radical biology & Medicine* **25**, 720-727.
- Lahann, J., Klee, D., Thelen, H., Bienert, H., Vorwerk, D. und Höcker, H. (1999). Improvement of haemocompatibility of metallic stents by polymer coating. *Journal of Materials Science - Materials in Medicine* **10**, 443-448.
- Lange, H., Wötting, G. und Winter, G. (1991). Siliciumnitrid - vom Pulver zum keramischen Werkstoff. *Angewandte Chemie* **103**, 1606-1652.
- Langer, R. und Vacanti, J. P. (1995). Artificial organs. *Scientific American* , 100-103.
- Lantos, P. R. (1988). Plastics in medical applications. *J Biomater Appl* **2**, 358-71.
- Lemercier, J. N., Padmaja, S., Cueto, R., Squadrito, G. L., Uppu, R. M. und Pryor, W. A. (1997). Carbon dioxide modulation of hydroxylation and nitration of phenol by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* **345**, 160-70.
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R. und Shacter, E. (1994). Carbonyl Assays for Determination of Oxidatively Modified Proteins. In "Methods in Enzymology" (L. Packer, ed.), vol. 233, pp. 346-356. Academic Press, San Diego.
- Lewis, S. A. und Levine, R. L. (1995). Determination of 2-Oxohistidine by Amino-Acid Analysis. *Analytical Biochemistry* **231**, 440-446.

- Li, S. und McCarthy, S. (1999). Further investigations on the hydrolytic degradation of poly (DL-lactide). *Biomaterials* **20**, 35-44.
- Liefeith, K., Sauberlich, S., Frant, M., Klee, D., Richter, E. J., Höcker, H. und Spiekermann, H. (1998). Characterization of the properties of differently modified titanium surfaces for dental implantology. 1: Methods for surface analysis. *Biomed Tech (Berl)* **43**, 330-5.
- Lin, J. K. und Chang, J. Y. (1975). Chromophoric labeling of amino acids with 4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride. *Anal Chem* **47**, 1634-8.
- Lyras, L., Evans, P. J., Shaw, P. J., Ince, P. G. und Halliwell, B. (1996). Oxidative damage and motor neurone disease difficulties in the measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Free Radic Res* **24**, 397-406.
- Ma, Z., Zhao, B. und Yuan, Z. (1999). Application of electrochemical and spin trapping techniques in the investigation of hydroxyl radicals. *Analytica Chimica Acta* **389**, 213-218.
- Malencik, D. A., Zhao, Z. Z. und Anderson, S. R. (1990). Determination of dityrosine, phosphotyrosine, phosphothreonine, and phosphoserine by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **184**, 353-9.
- Maroudas, N. G. (1975). Adhesion and spreading of cells on charged surfaces. *J Theor Biol* **49**, 417-24.
- Massia, S. P. und Hubbell, J. A. (1991). Human endothelial cell interactions with surface-coupled adhesion peptides on a nonadhesive glass substrate and two polymeric biomaterials. *J Biomed Mater Res* **25**, 223-42.
- Merker, K. und Grune, T. (2000). Proteolysis of oxidised proteins and cellular senescence. *Exp Gerontol* **35**, 779-86.
- Meyer, H. E., Eisermann, B., Heber, M., Hoffmann-Posorske, E., Korte, H., Weigt, C., Wegner, A., Hutton, T., Donella-Deana, A. und Perich, J. W. (1993). Strategies for nonradioactive methods in the localization of phosphorylated amino acids in proteins. *Faseb J* **7**, 776-82.



- Mihm, M. J., Schanbacher, B. L., Wallace, B. L., Wallace, L. J., Uretsky, N. J. und Bauer, J. A. (2001). Free 3-nitrotyrosine causes striatal neurodegeneration in vivo. *J Neurosci* **21**, RC149.
- Moncada, S., Radomski, M. W. und Palmer, R. M. (1988). Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol* **37**, 2495-501.
- Moulian, N., Truffault, F., Gaudry-Talarmain, Y. M., Serraf, A. und Berrih-Aknin, S. (2001). In vivo and in vitro apoptosis of human thymocytes are associated with nitrotyrosine formation. *Blood* **97**, 3521-30.
- Muijsers, R. B., Folkerts, G., Henricks, P. A., Sadeghi-Hashjin, G. und Nijkamp, F. P. (1997). Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. *Life Sci* **60**, 1833-45.
- Nanci, A., Wuest, J. D., Peru, L., Brunet, P., Sharma, V., Zalzal, S. und McKee, M. D. (1998). Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res* **40**, 324-35.
- Nathan, C. und Xie, Q. W. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* **269**, 13725-8.
- Nerlich, A. G., Zink, A., Szeimies, U. und Hagedorn, H. G. (2000). Ancient Egyptian prosthesis of the big toe. *The Lancet* **356**, 2176-2179.
- Oberpenning, F., Meng, J., Yoo, J. J. und Atala, A. (1999). De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering [see comments]. *Nat Biotechnol* **17**, 149-55.
- Obin, M., Shang, F., Gong, X., Handelman, G., Blumberg, J. und Taylor, A. (1998). Redox regulation of ubiquitin-conjugating enzymes: mechanistic insights using the thiol-specific oxidant diamide. *Faseb J* **12**, 561-9.
- Onorato, J. M., Thorpe, S. R. und Baynes, J. W. (1998). Immunohistochemical and ELISA assays for biomarkers of oxidative stress in aging and disease. *Ann N Y Acad Sci* **854**, 277-90.

- Pacifici, R. E., Kono, Y. und Davies, K. J. (1993). Hydrophobicity as the signal for selective degradation of hydroxyl radical-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J Biol Chem* **268**, 15405-11.
- Parkinson, J. F. (1997). Nitric Oxide Synthase Isoforms and Nitric Oxide Biosynthesis. In "Nitric Oxide, Cytochromes P450, and sexual Steroid Hormones" (J. R. J. Lancaster and J. F. Parkinson, eds), vol. Workshop 21, pp. 1-27. Springer, Berlin.
- Pfeiffer, S., Schmidt, K. und Mayer, B. (2000). Dityrosine Formation Outcompetes Tyrosine Nitration at Low Steady-state Concentrations of Peroxynitrite. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 6346-6352.
- Planck, H. (1993). "Kunststoffe und Elastomere in der Medizin". W. Kohlhammer, Stuttgart.
- Podmore, I. D., Griffiths, H. R., Herbert, K. E., Mistry, N., Mistry, P. und Lunec, J. (1998). Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature* **392**, 559.
- Pou, S., Nguyen, S. Y., Gladwell, T. und Rosen, G. M. (1995). Does peroxynitrite generate hydroxyl radical? *Biochim Biophys Acta* **1244**, 62-8.
- Privat, C., Lantoine, F., Bedioui, F., Millanvoye van Brussel, E., Devynck, J. und Devynck, M. A. (1997). Nitric oxide production by endothelial cells: comparison of three methods of quantification. *Life Sci* **61**, 1193-202.
- Pryor, W. A. und Squadrito, G. L. (1995). The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* **268**, L699-722.
- Puleo, D. A. (1996). Biochemical surface modification of Co-Cr-Mo. *Biomaterials* **17**, 217-22.
- Puleo, D. A. (1997). Retention of enzymatic activity immobilized on silanized Co-Cr-Mo and Ti-6Al-4V. *J Biomed Mater Res* **37**, 222-8.
- Puleo, D. A. und Nanci, A. (1999). Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* **20**, 2311-21.
- Quinlan, G. J., Evans, T. W. und Gutteridge, J. M. (1994). Oxidative damage to plasma proteins in adult respiratory distress syndrome. *Free Radic Res* **20**, 289-98.

- Quinn, C. P., Pathak, C. P., Heller, A. und Hubbell, J. A. (1995). Photo-crosslinked copolymers of 2-hydroxyethyl methacrylate, poly(ethylene glycol) tetra-acrylate and ethylene dimethacrylate for improving biocompatibility of biosensors. *Biomaterials* **16**, 389-96.
- Roberts, J. D., Polaner, D. M., Lang, P. und Zapol, W. M. (1992). Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* **340**, 818-9.
- Rohen, J. W. (1998). "Funktionelle Anatomie des Menschen". Verlag Schattauer, Stuttgart.
- Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M. und Freeman, B. A. (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* **269**, 26066-75.
- Salman-Tabcheh, S., Guerin, M. C. und Torreilles, J. (1995). Nitration of tyrosyl-residues from extra- and intracellular proteins in human whole blood. *Free Radic Biol Med* **19**, 695-8.
- Salva, M. und Aviles, F. X. (1989). Improvements in the application of the 4,4-N,N-dimethylaminoazobenzene-4'-isothiocyanate micromethod to the sequence analysis of proteins. *Anal Biochem* **180**, 374-9.
- Sano, S., Kato, K. und Ikada, Y. (1993). Introduction of functional groups onto the surface of polyethylene for protein immobilization. *Biomaterials* **14**, 817-22.
- Saran, M., Beck-Speier, I., Fellerhoff, B. und Bauer, G. (1999). Phagocytic killing of microorganisms by radical processes: consequences of the reaction of hydroxyl radicals with chloride yielding chlorine atoms. *Free Radic Biol Med* **26**, 482-90.
- Sauberlich, S., Liefelth, K., Frant, M., Klee, D., Richter, E. J., Höcker, H. und Spiekermann, H. (1998). Characterization of the properties of differentially modified titanium surfaces for dental implantology. 2: In vitro biocompatibility studies. *Biomed Tech (Berl)* **43**, 360-6.

- Sawhney, A. S. und Hubbell, J. A. (1990). Rapidly degraded terpolymers of dl-lactide, glycolide, and epsilon-caprolactone with increased hydrophilicity by copolymerization with polyethers. *J Biomed Mater Res* **24**, 1397-411.
- Schwemmer, M., Fink, B., Köckerbauer, R. und Bassenge, E. (2000). How urine analysis reflects oxidative stress - nitrotyrosine as a potential marker. *Clinica Chimica Acta* **297**, 207-216.
- Semlitsch, M., Weber, H., Streicher, R. M. und Schon, R. (1991). Joint prostheses components of warm-forged and surface treated Ti-6Al-7Nb alloy. *Biomed Tech (Berl)* **36**, 112-9.
- Shang, F., Gong, X. und Taylor, A. (1997). Activity of ubiquitin-dependent pathway in response to oxidative stress. Ubiquitin-activating enzyme is transiently up-regulated. *J Biol Chem* **272**, 23086-93.
- Sharpe, J. R., Sammons, R. L. und Marquis, P. M. (1997). Effect of pH on protein adsorption to hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramics. *Biomaterials* **18**, 471-6.
- Shigenaga, M. K., Lee, H. H., Blount, B. C., Christen, S., Shigeno, E. T., Yip, H. und Ames, B. N. (1997). Inflammation and NO(X)-induced nitration: assay for 3-nitrotyrosine by HPLC with electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3211-6.
- Simmons, G. W. und Beard, B. C. (1987). Characterization of Acid-Base Properties of the Hydrated Oxides on Iron and Titanium Metal Surfaces. *J.Phys.Chem* **91**, 1143-1148.
- Skinner, K. A., Crow, J. P., Skinner, H. B., Chandler, R. T., Thompson, J. A. und Parks, D. A. (1997). Free and protein-associated nitrotyrosine formation following rat liver preservation and transplantation. *Arch Biochem Biophys* **342**, 282-8.
- Sohrabi, A., Holland, C., Kue, R., Nagle, D., Hungerford, D. S. und Frondoza, C. G. (2000). Proinflammatory cytokine expression of IL-1beta and TNF-alpha by human osteoblast-like MG-63 cells upon exposure to silicon nitride in vitro. *J Biomed Mater Res* **50**, 43-9.

- Souza, J. M., Choi, I., Chen, Q., Weisse, M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Obin, M., Ara, J., Horwitz, J. und Ischiropoulos, H. (2000). Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins. *Arch Biochem Biophys* **380**, 360-6.
- Stadtman, E. R. (1993). Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* **62**, 797-821.
- Steineman, S. G. (1980). Corrosion of surgical implants - in vivo and in vitro tests. In "Evaluation of biomaterials" (G. D. Winter, J. L. Leroy and K. de Groot, eds), pp. 1-34. John Wiley&Sons Ltd.
- Stocchi, V., Piccoli, G., Magnani, M., Palma, F., Biagiarelli, B. und Cucchiari, L. (1989). Reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of dimethylaminoazobenzene sulfonyl- and dimethylaminoazobenzene thiohydantoin-amino acid derivatives for amino acid analysis and microsequencing studies at the picomole level. *Anal Biochem* **178**, 107-17.
- Streicher, R. M., Schon, R. und Semlitsch, M. F. (1990). Possibilities for optimizing gliding combinations against ultra-high molecular polyethylene for artificial joints. *Biomed Tech (Berl)* **35**, 78-83.
- Su, Z., Ishida, H., Fukuyama, N., Todorov, R., Genka, C. und Nakazawa, H. (1998). Peroxynitrite is not a major mediator of endothelial cell injury by activated neutrophils in vitro. *Cardiovascular Research* **39**, 485-491.
- ter Steege, J. C., Koster-Kamphuis, L., van Straaten, E. A., Forget, P. P. und Buurman, W. A. (1998). Nitrotyrosine in plasma of celiac disease patients as detected by a new sandwich ELISA. *Free Radic Biol Med* **25**, 953-63.
- Thews, G., Mutschler, E. und Vaupel, P. (1999). "Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen". Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Thissen, H. (1999). Oberflächenmodifizierung resorbierbarer Polymere für den Einsatz in der Medizin. Dissertation, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen.

- Tilley, K. A., Benjamin, R. E., Bagorogoza, K. E., Okot-Kotber, B. M., Prakash, O. und Kwen, H. (2001). Tyrosine cross-links: molecular basis of gluten structure and function. *J Agric Food Chem* **49**, 2627-32.
- Tsikis, D., Gutzki, F. M., Rossa, S., Bauer, H., Neumann, C., Dockendorff, K., Sandmann, J. und Frolich, J. C. (1997). Measurement of nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry and by the Griess assay: problems with the Griess assay--solutions by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* **244**, 208-20.
- Tsuda, H., Yamada, S., Miyazono, H., Morikawa, K., Yoshida, K., Goto, F., Tamura, J. I., Neumann, K. W., Ogawa, T. und Sugahara, K. (1999). Substrate specificity studies of Flavobacterium chondroitinase C and heparitinases towards the glycosaminoglycan--protein linkage region. Use of a sensitive analytical method developed by chromophore-labeling of linkage glycoserines using dimethylaminoazobenzenesulfonyl chloride. *Eur J Biochem* **262**, 127-33.
- Uchida, K. und Kawakishi, S. (1993). 2-Oxo-histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins. *FEBS Lett* **332**, 208-10.
- Ulbricht, M. und Riedel, M. (1998). Ultrafiltration membrane surfaces with grafted polymer 'tentacles': preparation, characterization and application for covalent protein binding. *Biomaterials* **19**, 1229-1237.
- Uppu, R. M. und Pryor, W. A. (1996). Synthesis of peroxynitrite in a two-phase system using isoamyl nitrite and hydrogen peroxide. *Anal Biochem* **236**, 242-9.
- Uppu, R. M., Squadrito, G. L., Cueto, R. und Pryor, W. A. (1996a). Selecting the Most Appropriate Synthesis of Peroxynitrite. In "Methods in Enzymology" (L. Packer, ed.), vol. 269, pp. 285-295. Academic Press, San Diego.
- Uppu, R. M., Squadrito, G. L. und Pryor, W. A. (1996b). Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide. *Arch Biochem Biophys* **327**, 335-43.
- Valuev, I. L., Vladimir, V. C. und Valuev, L. I. (1998). Chemical modification of polymers with physiologically active species using water-soluble carbodiimides. *Biomaterials* **19**, 41-43.

- van der Vliet, A., Eiserich, J. P., Halliwell, B. und Cross, C. E. (1997). Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide- dependent toxicity. *J Biol Chem* **272**, 7617-25.
- van der Vliet, A., Eiserich, J. P., Kaur, H., Cross, C. E. und Halliwell, B. (1996). Nitrotyrosine as biomarker for reactive nitrogen species. *Methods Enzymol* **269**, 175-84.
- Vert, M., Li, S. M., Spenlehauer, G. und Guerin, P. (1992). Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *Journal of materials science: Materials in medicine* **3**, 432-446.
- Visscher, G. E., Robison, R. L., Maulding, H. V., Fong, J. W., Pearson, J. E. und Argentieri, G. J. (1985). Biodegradation of and tissue reaction to 50:50 poly(DL-lactide-co-glycolide) microcapsules. *J Biomed Mater Res* **19**, 349-65.
- Vissers, M. C. und Winterbourn, C. C. (1991a). Oxidative damage to fibronectin. I. The effects of the neutrophil myeloperoxidase system and HOCl. *Arch Biochem Biophys* **285**, 53-9.
- Vissers, M. C. und Winterbourn, C. C. (1991b). Oxidative damage to fibronectin. II. The effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the hydroxyl radical. *Arch Biochem Biophys* **285**, 357-64.
- Völcker, N. (1999). Plasmagestützte Generierung von Oberflächenfunktionalität auf vernetztem Polydimethylsiloxan zur Immobilisierung von zellwachstumsfördernden Proteinen. Dissertation, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen.
- Weetall, H. H. (1970). Storage stability of water-insoluble enzymes covalently coupled to organic and inorganic carriers. *Biochim Biophys Acta* **212**, 1-7.
- Weetall, H. H. (1976). Covalent coupling methods for inorganic support materials. In "Methods in Enzymology", vol. 44, pp. 134-148.
- Welinder, K. G. (1976). Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7). *FEBS Lett* **72**, 19-23.

- Whiteman, M. und Halliwell, B. (1999). Loss of 3-nitrotyrosine on exposure to hypochlorous acid: implications for the use of 3-nitrotyrosine as a bio-marker in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **258**, 168-72.
- Willert, H. G., Bertram, H. und Buchhorn, G. H. (1990). Osteolysis in alloarthroplasty of the hip. The role of ultra-high molecular weight polyethylene wear particles. *Clin Orthop* , 95-107.
- Williams, D. F. (1981). Electrochemical aspects of corrosion in the physiological environment. In "Fundamental aspects of biocompatibility" (D. F. Williams, ed.), pp. 11-42. CRC Press, Boca Raton.
- Wilson, G. A. et al. (1996). "Fundamental Facts. Cell Adhesion Molecules". R&D Systems, Minneapolis.
- Wintermantel, E. und Ha, S.-W. (1998). "Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen". Springer Verlag, Berlin.
- Yarmush, M. L., Toner , M., Dunn, J. C. Y., Rotem, A., Hubel, A. und Tomkins, R. G. (1992). Hepatic tissue engineering: Development of critical technologies. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **665**, 472-485.
- Ye, Y. Z., Strong, M., Huang, Z.-Q. und Beckman, J. S. (1996). Antibodies that recognize nitrotyrosine. In "Methods in Enzymology" (L. Packer, ed.), vol. 269, pp. 201-209. Academic Press, San Diego.
- Yermilov, V., Yoshie, Y., Rubio, J. und Ohshima, H. (1996). Effects of carbon dioxide/bicarbonate on induction of DNA single-strand breaks and formation of 8-nitroguanine, 8-oxoguanine and base-propenal mediated by peroxynitrite. *FEBS Lett* **399**, 67-70.
- Yi, D., Ingelse, B. A., Duncan, M. W. und Smythe, G. A. (2000). Quantification of 3-nitrotyrosine in biological tissues and fluids: generating valid results by eliminating artifactual formation. *J Am Soc Mass Spectrom* **11**, 578-86.



## 7 Anhang

### Aminosäurezusammensetzung Meerrettichperoxidase (HRP)

308 AS, Mw 33918 Da, pI 6,35

Aminosäure	Anzahl	Mol%
Ala	23	7,45
Arg	21	6,81
Asn	27	8,76
Asp	21	6,81
Cys	8	2,59
Gln	13	4,22
Glu	7	2,27
Gly	17	5,51
His	3	0,97
Ile	13	4,22
Leu	35	11,36
Lys	6	1,94
Met	4	1,29
Phe	20	6,49
Pro	17	5,51
Ser	25	8,11
Thr	25	8,11
Trp	1	0,32
Tyr	5	1,62
Val	17	5,51

## Aminosäurezusammensetzung Rinderserumalbumin (BSA)

583 AS, Mw 66433Da, pI 5,60

Aminosäure	Anzahl	Mol%
Ala	47	8,1
Arg	23	3,9
Asn	14	2,4
Asp	40	6,9
Cys	35	6,0
Gln	20	3,4
Glu	59	10,1
Gly	16	2,7
His	17	2,9
Ile	14	2,4
Leu	61	10,5
Lys	59	10,1
Met	4	0,7
Phe	27	4,6
Pro	28	4,8
Ser	28	4,8
Thr	33	5,7
Trp	2	0,3
Tyr	20	3,4
Val	36	6,2

Aminosäurezusammensetzung  $\beta$ -Lactoglobulin

162 AS, Mw 18281 Da, pI 4,83

Aminosäure	Anzahl	Mol%
Ala	15	9,3
Arg	3	1,9
Asn	5	3,1
Asp	10	6,2
Cys	5	3,1
Gln	9	5,6
Glu	16	9,9
Gly	4	2,5
His	2	1,2
Ile	10	6,2
Leu	22	13,6
Lys	15	9,3
Met	4	2,5
Phe	4	2,5
Pro	8	4,9
Ser	7	4,3
Thr	8	4,9
Trp	2	1,2
Tyr	4	2,5
Val	9	5,6



## **Danksagung**

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. G. Buse danke ich für die Themenstellung sowie für die freundliche Unterstützung und Förderung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Höcker danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Bei Herrn Dr. G.C.M. Steffens bedanke ich mich für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit und für die stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn M. Dewor danke ich für die Durchführung der Aminosäureanalysen sowie für seine Unterstützung bei der Methodenentwicklung.

Bei Herrn Dr. D. Mihelcic vom ICG-2, Forschungszentrum Jülich, bedanke ich mich für die Aufnahme der ESR-Spektren.

Für die freundschaftliche Aufnahme, nicht nur im Labor, danke ich Herrn PD Dr. T. Soulimane, Herrn M. von Walter und Frau A. Schell. Auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Zanssen möchte ich für das angenehme Arbeitsklima danken.

Frau H. Didden sowie Frau M. Tartarek-Nossol danke ich für die Übermittlung ihrer labortechnischen Kenntnisse.

Herrn M. Robbertz, Frau R. Urlichs sowie Frau R. Kehren danke ich für ihre Unterstützung ausserhalb des Labors.

Herrn H. Szameit danke ich für die Lösung elektrischer/elektronischer Probleme, Frau A. Kriescher danke ich für die allzeit verlässlich saubere Glasgerätschaft.

Frau A. Küster danke ich für die mir zur Verfügung gestellte Zeit.

Schließlich möchte ich mich auch bei allen nicht im Einzelnen aufgeführten Kolleginnen und Kollegen am Institut für Biochemie für die freundliche Zusammenarbeit bedanken.



# Lebenslauf

## **Persönliche Daten**

---

Name	Lars Nothdurft
Geburtsdatum	16.04.1967
Geburtsort	Stuttgart

## **Ausbildung**

---

### Schulausbildung

1973 – 1977	Friedrich-Silcher-Grundschule, Böblingen
1977 - 1985	Albert-Einstein-Gymnasium, Böblingen
1985 - 1987	Max-Planck-Gymnasium, Böblingen
1987	Abitur

### Studium

1989 - 1997	Studium an der Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen Studienfach Chemie/Diplom
-------------	--

Mai 1992	Diplomvorprüfung
März – August 1994	Forschungsaufenthalt an der Universität Cambridge (UK)

Mai 1996	Diplomhauptprüfung
Juli 1996 – April 1997	Diplomarbeit am Institut für Botanik und Pharmazeutische Biologie

Mai 1997 - Oktober 2001	Promotion am Institut für Biochemie der RWTH-Aachen
-------------------------	---